

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO DA SAÚDE DA CRIANÇA E DO
ADOLESCENTE

**AVALIAÇÃO DE MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS E
LABORATORIAIS EM HETEROZIGOTAS PARA
MUCOPOLISSACARIDOSE TIPO II**

TESE DE DOUTORADO

LOUISE LAPAGESSE DE CAMARGO PINTO

Porto Alegre, Brasil 2009

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO DA SAÚDE DA CRIANÇA E DO
ADOLESCENTE

**AVALIAÇÃO DE MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS E
LABORATORIAIS EM HETEROZIGOTAS PARA
MUCOPOLISSACARIDOSE TIPO II**

ROBERTO GIUGLIANI

LOUISE LAPAGESSE DE CAMARGO PINTO

"A apresentação desta tese é exigência do Programa
de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do
Adolescente da Universidade do Rio Grande do
Sul, para obtenção do título de doutor"

Porto Alegre, Brasil 2009

P659a Pinto, Louise Lapagesse de Camargo

Avaliação de manifestações clínicas e laboratoriais em heterozigotas para mucopolissacridose tipo II / Louise Lapagesse de Camargo Pinto ; orient. Roberto Giugliani. – 2009.

234 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente. Porto Alegre, BR-RS, 2009.

1. Mucopolissacaridose II 2. Heterozigoto 3. Doenças genéticas ligadas ao cromossomo X 4. Inativação do cromossomo X I. Giugliani, Roberto II. Título.

NLM: WS 107

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM

SAÚDE DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE

ESTA DISSERTAÇÃO / TESE FOI DEFENDIDA PUBLICAMENTE EM:

09/09/2009

E, FOI AVALIADA PELA BANCA EXAMINADORA COMPOSTA POR:

PROF. DR. GIORGIO ADRIANO PASKULIN

[INSTITUIÇÃO] UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PORTO ALEGRE

PROF. DR. LAVÍNIA SCHÜLER FACCININ

[INSTITUIÇÃO] UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

PROF. DR. CAROLINA FISCHINGER DE MOURA

[INSTITUIÇÃO] HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE

PROF. DR. MARIA TERESA SANSEVERINO

[INSTITUIÇÃO] HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais que sempre estiveram comigo
para que eu pudesse trilhar esse caminho

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Roberto Giugliani, orientador deste trabalho, a quem agradeço por ter me incentivado todos esses anos. A sua presença foi fundamental para que eu chegasse até esse destino.

À professora Dra. Ida Vanessa Doederlein Schwartz que sempre foi uma grande incentivadora e que foi fundamental para a elaboração dessa tese. Muito obrigada por todos os ensinamentos e em especial a presença tão próxima nesses últimos meses.

Aos meus professores e colegas da UFCSPA que sem eles eu não teria sido apresentada de maneira tão especial à genética.

Às minhas colegas Andressa Federhen e Silvia Brustolin que além do trabalho em equipe, construímos uma amizade.

À minha amiga Taiane Alves Vieira, uma amiga que quero levar para toda vida.

Às amigas Márcia Camaratta Anton, Gisele Ruaro Teixeira, Priscila Corrêa e Márcia Fontana que são amigas de uma longa vida.

Às amigas superpoderosas Ana Paula Brandalize e Renata dos Santos Coura por tornarem minha vida mais feliz.

Ao Filippo Vairo que aceitou o desafio de contribuir para essa tese.

Às familiares e aos pacientes que aceitaram em participar desse projeto.

Ao Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente da UFGRS pela oportunidade de construção do conhecimento.

Às agências de fomento CAPES, FIPE e REDE MPS pelo suporte financeiro.

Aos meus pais que sempre estiveram do meu lado e que sem eles eu não poderia ter chegado até aqui. Obrigada por tanto amor!

A todos que contribuíram para que esse sonho se tornasse realidade.

Muito obrigada! Porque a vida só faz sentido, quando a gente empresta a nossa vida, para o resto da vida!

EPIGRAFE

“De tudo ficaram três coisas

A certeza de que estamos começando

A certeza de que é preciso continuar

A certeza de que podemos ser interrompidos antes de terminar

Façamos da interrupção um caminho novo

Da queda, um passo de dança

Do medo, uma escada

Do sonho, uma ponte

Da procura, um encontro”

(Fernando Sabino)

RESUMO

Introdução: A maioria das doenças lisossômicas são herdadas como traços recessivos, mas a mucopolissacaridose tipo II (MPS II) é de herança ligada ao cromossomo X. As doenças ligadas ao cromossomo X possuem um importante impacto para as famílias devido ao risco que as heterozigotas apresentam em ter um filho afetado. A maioria das heterozigotas para as doenças ligadas ao cromossomo X são clinicamente assintomáticas. Em relação à MPS II somente dez mulheres afetadas foram relatadas na literatura. Entretanto, nenhum estudo foi realizado para a avaliação da presença de sinais sutis da doença nessas heterozigotas.

Objetivo: o objetivo principal desse estudo foi a identificação de sinais clínicos sutis e bioquímicos relacionados à MPS II nas heterozigotas para essa doença e adicionalmente estabelecer a associação desses achados com o padrão de inativação do cromossomo X.

Métodos: esse foi um estudo observacional e transversal. Essas mulheres foram classificadas como heterozigotas e não heterozigotas baseadas na análise molecular do gene da iduronato sulfatase (IDS). Ambos grupos foram comparados com relação às seguintes variáveis: dados clínicos, achados do exame físico, cariótipo, padrão de inativação do cromossomo X (ensaio HUMARA), atividades da IDS em leucócitos e plasma, níveis de glicosaminoglicanos na urina, tomografia computadorizada de abdomen e coluna e ressonância magnética de crânio.

Resultados: Quarenta mulheres pertencentes a 24 famílias foram avaliadas. De acordo com a análise do DNA 22 foram classificadas em heterozigotas e 18 em não heterozigotas. Não foi encontrada nenhuma anormalidade no exame físico (n=40), cariótipo (n=31/40) ou na TC de coluna (n=31/40). A incidência de abortamento também não apresentou diferenças entre essas mulheres. Entretanto, a atividade da IDS em plasma ($p < 0,001$) e em leucócitos ($p < 0,001$) apresentaram níveis inferiores nas heterozigotas. A correção de Bonferroni foi aplicada e não foi encontrada nenhuma diferença entre os grupos dentre as variáveis analisadas. Também em relação ao padrão de inativação do cromossomo X não foi observada diferença entre as heterozigotas e não heterozigotas.

Conclusões: Esse é o primeiro estudo sistemático realizado em heterozigotas para MPS II. Não foi encontrada nenhuma evidência de manifestações clínicas sutis ou sinais radiológicos da doença MPS II nessas mulheres. Nossos achados sugerem que não existe relação entre a ausência dos sinais clínicos nessas mulheres e a ocorrência de um padrão favorável de desvio da inativação do cromossomo X. Esses dados sugerem que a MPS II apresenta uma baixa penetrância nas heterozigotas.

Palavras-chaves: heterozigotas, mucopolissacaridose tipo II, padrão de inativação do cromossomo X e herança ligada ao cromossomo X.

ABSTRACT

Introduction: Most lysosomal diseases are inherited as recessive traits, but muchopolysaccharidosis type II (MPS II) presents X-linked inheritance. The X-linked disorders have an important impact for families because the risk heterozygous present of having an affected child. Most heterozygotes for X-linked disorders are clinically asymptomatic. Regarding MPS II only ten affected females have been reported in the literature. However, none study has been taken in order to evaluate subtle signs of the disease in heterozygotes.

Objective: The main objective of this study was to identify subtle clinical and biochemical signs of MPS II in heterozygotes for this disease, and to correlate the findings with the pattern of X chromosome inactivation presented by these women.

Methods: This was an observational, transversal and controlled study. The women were classified as heterozygote or non-heterozygote based on molecular analysis of the iduronate sulfatase (IDS) gene. Both groups were compared between regarding clinical data, physical exam findings, karyotype, pattern of X inactivation (HUMARA assay), IDS activity in leukocytes and plasma, glycosaminoglicans levels in urine, computadorized tomography scans of abdomen and spine, and brain magnetic resonance imaging.

Results: Forty women from 24 families were evaluated. According to DNA analysis, 22 women were classified as heterozygote and 18 as non-heterozygotes. We did not find any abnormality in physical examination (n=40), karyotype (n=31/40) or spine CT scans (n=31/40). The incidence of miscarriage also did not differ between these females. However, IDS activities in plasma ($p<0.001$) and in leukocyte ($p<0.001$) were lower in heterozygotes. Applying the Bonferroni's correction, we did not find any difference between the groups regarding the variables analyzed. Also the pattern of X chromosome inactivation was not different between heterozygotes and non-heterozygotes.

Conclusion: This is the first systematic study performed in heterozygotes for MPS II. We did not find any evidence of subtle clinical manifestations or radiological signs of MPS II disease in these females. Our findings suggest that there is no relation between the absence of clinical signs in these women and the occurrence of a favorable skewing pattern of X chromosome inactivation. This data suggests that MPS II is a disease which shows low penetrance in heterozygotes.

Keywords: heterozygotes, mucopolysaccharidosis type II, X inactivation pattern and X linked inheritance.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Fluxograma para o diagnóstico das MPS

Figura 2 - Localização dos genes em algumas doenças que apresentam herança ligada ao cromossomo X

Figura 3 - Hipótese de Lyon.

Figura 4 - Estrutura do *Xic*

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - As Mucopolissacaridoses

Quadro 2 - Métodos de identificação de heterozigotas para MPS II

Quadro 3 - Classificação tradicional das doenças ligadas ao cromossomo X

Quadro 4 – Dados disponíveis na literatura sobre a caracterização clínica e molecular das mulheres sintomáticas com Mucopolissacaridose tipo II

Quadro 5 - Métodos de identificação do padrão da inativação do cromossomo X

LISTA DE ABREVIATURAS

ADNPM - Atraso do desenvolvimento neuropsicomotor

ATP - Trifosfato de adenosina

cDNA - DNA complementar

CTCF - Fator de ligação-CCTC

DLDs - Doenças lisossômicas de depósito

DNA - Ácido desoxirribonucléico

FMRI - Fragile X mental retardation protein

FLAIR - Fluid attenuated inversion recovery

GAGs - Glicosaminoglicanos

GM1 - Gangliosídeo GM1

GM2 - Gangliosídeo GM2

GM3 - Gangliosídeo GM3

G6PD - Glicose-6-fosfato desidrogenase

GPPG - Grupo de pós-graduação em pesquisa

HCPA - Hospital de clínicas de Porto Alegre

HUMARA - Gene do receptor de andrógeno

IDS - Iduronato-2-sulfatase

INCA - Instituto nacional do câncer

LREIM - Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo

MPS I - Mucopolissacaridose tipo I

MPS II - Mucopolissacaridose tipo II

MPS III - Mucopolissacaridose tipo III

MPS IV - Mucopolissacaridose tipo IV

MPS VI - Mucopolissacaridose tipo VI

MPS VII - Mucopolissacaridose tipo VII

NIH - *National institute of health*

PCR - Reação em cadeia de polimerase

PAR1 - Região pseudoautossômica 1

PAR2 - Região pseudoautossômicas 2

RFLPs - Restriction fragment length polymorphisms

RM - Ressonância magnética

RNA - Ácido ribonucléico

RNA_m - RNA mensageiro

SGM/HCPA - Serviço de genética médica do hospital de clínicas de Porto Alegre

SSCP - Single strand conformation polymorphism

TC - Tomografia computadorizada

TCLE - Termo de consentimento livre e esclarecido

TRE - Terapia de reposição enzimática

Tsix - inactivation-specific transcript-antisense

Xce - X chromosome-controlling element

XIC/*Xic* - centro da inativação do cromossomo X

XIST/*Xist* - *X inactivation-specific sranscript*

Xite - X inactivation intergenic transcription element

SUMÁRIO

RESUMO.....	VIII
ABSTRACT.....	X
LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	XII
LISTA DE QUADROS.....	XIII
LISTA DE ABREVIATURAS.....	IX
1 INTRODUÇÃO.....	21
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	23
2.1 As Doenças Lisossômicas de Depósito.....	23
2.2 As Mucopolissacaridoses.....	24
2.2.1 A Mucopolissacaridose Tipo II (Síndrome de Hunter).....	27
2.2.1.1 Manifestações Clínicas da MPS II.....	30
2.2.1.2 Diagnóstico dos Pacientes com MPS II.....	32
2.2.1.3 Manejo dos Pacientes com MPS II.....	32
2.2.1.4 Diagnóstico Pré-Natal na MPS II.....	34
2.2.1.5 A Enzima IDS.....	35
2.2.1.6 O Gene <i>IDS</i>	36
2.2.1.7 Associação Genótipo-Fenótipo na MPS II.....	37
2.2.1.8 Detecção de Heterozigotas para MPS II.....	38
2.2.1.8.1 Métodos de Identificação de Heterozigotas para MPS II.....	39

2.3 O Cromossomo X.....	42
2.4 Classificação das Doenças Ligadas ao Cromossomo X.....	43
2.5 A Inativação do Cromossomo X.....	45
2.5.1 Histórico das Pesquisas da Inativação do Cromossomo X.....	45
2.5.2 A Evolução do Mecanismo de Inativação do Cromossomo X.....	47
2.5.3 O Mecanismo de Inativação do Cromossomo X.....	48
2.5.4 Genes Envolvidos no Mecanismo da Inativação do Cromossomo X.....	50
2.5.5 Etapas da Inativação do Cromossomo X.....	52
2.5.5.1 Contagem.....	52
2.5.5.2 Escolha.....	53
2.5.5.3 Iniciação.....	54
2.5.5.4 Estabelecimento.....	55
2.5.5.5 Manutenção.....	55
2.5.6 Genes que Escapam da Inativação do Cromossomo X.....	56
2.5.7 O Desvio da Inativação do Cromossomo X.....	58
2.5.8 Etiologia do Desvio da Inativação do Cromossomo X.....	61
2.5.9 As Taxas de Desvio da Inativação do Cromossomo X e Idade.....	63
2.5.10 Heterozigotas para Doenças Ligadas ao cromossomo X e Abortamento de Repetição.....	65
2.5.11 Heterozigotas para Genes Ligados ao X e a Inativação do Cromossomo X.....	67
2.6 Mulheres Sintomáticas nas Doenças Ligadas ao Cromossomo X.....	68
2.6.1 Heterozigotas e Sinais e Sintomas de MPS II.....	70
2.6.2 Pacientes do Sexo Feminino com MPS II.....	70
2.7 Detecção do Padrão de Inativação do Cromossomo X.....	72
2.7.1 Detecção Das Taxas de Desvio da Inativação do Cromossomo X.....	73

3 JUSTIFICATIVA.....	77
4 OBJETIVOS.....	78
4.1 Geral.....	78
4.2 Específicos.....	78
5 METODOLOGIA.....	79
5.1 Delineamento.....	79
5.2. População do Estudo.....	79
5.3 Critérios de Inclusão.....	80
5.4 Critérios de Exclusão.....	80
5.5 Variáveis Estudadas.....	80
5.6 Análise Bioquímica.....	81
5.6.1 Dosagem da Excreção Urinária de GAGs.....	81
5.6.2 Medida da Atividade de IDS.....	82
5.7 Análise do Cariótipo.....	82
5.8 Análise Molecular do Gene da <i>IDS</i>	82
5.9 Análise do Padrão de Inativação do Cromossomo X.....	84
5.10 Exames de Imagem.....	85
5.10.1 Tomografia Computadorizada Abdominal de Fígado e de Baço.....	85
5.10.2 Tomografia Computadorizada da Coluna Lombar.....	86
5.10.3 Ressonância Magnética do Crânio.....	86
5.11 Análise Estatística.....	87
6 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....	89
6.1 Autorização para Pesquisa.....	89
6.2 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).....	89
7 ARTIGO DE REVISÃO.....	92

7.1 Expression of the disease on female carriers of X-linked lysosomal disorders: a brief review.....	92
7.2 Expressão das doenças lisossômicas ligadas ao cromossomo X nas heterozigotas: uma breve revisão.....	118
8 ARTIGO DOS RESULTADOS.....	145
8.1 Does MPS II heterozygotes are actually asymptomatic? A study based on clinical and biochemical data, X-inactivation analysis and imaging evaluations.....	145
8.2 As heterozigotas para MPS II são realmente assintomáticas? Um estudo baseado nos dados clínicos e bioquímicos, análise da inativação do cromossomo X e avaliações de radiológicas.....	163
9 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	180
10 CONCLUSÕES.....	183
11 REFERÊNCIAS.....	186
ANEXOS.....	209
ANEXO 1 –Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).....	210
ANEXO 2- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para obtenção de imagens fotográficas.....	213
ANEXO 3- Questionário e exame físico.....	215
ANEXO 4- Sumário dos dados epidemiológicos e clínicos das pacientes incluídas nesse estudo.....	220

INTRODUÇÃO

As Mucopolissacaridoses (MPS) são um grupo de doenças lisossômicas de depósito caracterizadas por serem progressivas, crônicas e debilitantes. Ao todo, existem onze tipos de MPS e somente na Mucopolissacaridose tipo II (MPS II) o modo de herança é ligado ao cromossomo X.

Existem ao redor de 600 doenças genéticas que possuem o mecanismo de herança ligado ao cromossomo X. Em algumas delas, é freqüente que heterozigotas possam vir a apresentar sinais e sintomas, que podem ser semelhantes aos dos hemizigotos. Os fatores que podem dificultar a identificação das heterozigotas são: heterogeneidade clínica, expressividade variável e penetrância reduzida. Adicionalmente, a raridade dessas doenças e a escassez de laboratórios que realizam as análises moleculares em nosso país para essas doenças também produzem limitações para a identificação de heterozigotas para doenças ligadas ao cromossomo X. Todas essas potenciais adversidades contribuem para que a confirmação do diagnóstico através da análise molecular possa não ser facilmente alcançado nas heterozigotas. Em conseqüência, o aconselhamento das familiares em risco para doenças raras ligadas ao cromossomo X pode ser um longo processo.

As doenças lisossômicas de depósito com herança ligada ao cromossomo X incluem a doença de Danon, a doença de Fabry e a MPS II.

Principalmente nos últimos anos, as heterozigotas acometidas pela doença de Fabry têm sido muito estudadas devido à possibilidade de receberem tratamento específico

(terapia de reposição enzimática). No caso da MPS II, os relatos existentes incluem somente as poucas heterozigotas sintomáticas identificadas até o momento. Entretanto, os mecanismos envolvidos no acometimento dessas pacientes ainda não estão totalmente elucidados.

Ao contrário da doença de Fabry, na qual as heterozigotas são acometidas em uma maior frequência, as heterozigotas para MPS II parecem ser raramente afetadas. O estudo dos mecanismos básicos envolvidos na patogênese da MPS II poderá fornecer pistas sobre a ausência de acometimento clínico. Através da elucidação dos principais aspectos bioquímicos e moleculares relacionados será possível alcançar um melhor entendimento a respeito dessa doença. Como consequência permitirá que o aconselhamento genético seja realizado de maneira mais adequada para as famílias em risco.

Essa tese de doutorado abordará as avaliações clínicas, bioquímicas, moleculares e radiológicas de mulheres com história familiar positiva para MPS II e está dividida nos seguintes capítulos principais: as doenças lisossômicas de depósito, as mucopolissacaridoses, o cromossomo X, classificação das doenças ligadas ao cromossomo X, a inativação do cromossomo X, heterozigotas para doenças ligadas ao cromossomo X e manifestações clínicas e detecção do padrão de inativação do cromossomo X.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 AS DOENÇAS LISSÔMICAS DE DEPÓSITO

As doenças lisossômicas de depósito (DLDs) têm incidência estimada em 1:7,000 recém nascidos vivos (MEIKLE *et al.*, 1999; POORTHIUS *et al.*, 1999) e compreendem mais de cinquenta condições diversas (WRAITH, 2002; WALKLEY, 2009). Essas doenças são decorrentes da atividade deficiente de uma enzima lisossômica, que pode ser uma hidrolase, ou da deficiência de co-fatores envolvidos no processo da degradação de macromoléculas, ou, ainda, de transportadores. A maioria das enzimas lisossômicas são exohidrolases que agem em seqüência, sendo os substratos degradados em etapas sucessivas através da remoção de seus resíduos terminais. A deficiência de uma enzima lisossômica causa bloqueio da via metabólica envolvida, levando à não remoção do substrato, o que o torna inacessível à hidrólise por outras enzimas lisossômicas (GIESELMANN, 1995). Na maioria das DLDs, mais de um composto é acumulado; por exemplo, na MPS II (MIM 30900) os principais substratos acumulados são os GAGs sulfato de dermatan e o sulfato de heparan, mas outras substâncias como os gangliosídeo GM2, gangliosídeo GM3 e subunidade C do trifosfato de adenosina (ATP) da sintase mitocondrial também são acumulados principalmente no sistema nervoso central (BALLABIO; GIESELMANN, 2009).

Embora as DLDs sejam tradicionalmente classificadas de acordo com a deficiência enzimática e com o substrato acumulado, Platt e Walkley (2004) sugerem uma nova classificação baseada nas alterações moleculares. A classificação está dividida em sete

grupos sendo que o último inclui doenças que não preenchem os critérios anteriores: 1) defeito primário de uma hidrolase lisossômica (por exemplo, MPS II, doença de Gaucher e doença de Fabry); 2) defeito do processamento de enzimas lisossômicas (por exemplo, Deficiência múltipla de sulfatases); 3) defeito do transporte das enzimas lisossômicas (por exemplo, Mucopolioses tipo II, IIIA e IIIC); 4) defeito na proteção das enzimas lisossômicas (por exemplo, Galactosialidose); 5) defeito das proteínas não enzimáticas solúveis (por exemplo, doença de Niemann-Pick tipo C subtipo 2, Lipofuccinose neuronal ceróide tipo 5 e Gangliosidose tipo 2 variante AB); 6) Defeito (não enzimático) de proteínas transmembrana (por exemplo, doença de Danon, doença de Niemann-Pick tipo C subtipo 1 e Lipofuccinose neuronal ceróide tipo 6) e 7) Sem classificação até o presente momento (por exemplo, Lipofuccinose neuronal ceróide tipo 7). Muitas hidrolases não são específicas para cada substrato e doenças diferentes causadas por deficiências enzimáticas diversas podem apresentar o mesmo tipo de substrato acumulado, como por exemplo, a Mucopolissacaridose tipo I (MPS I) e a MPS II. Ainda nesse sentido podem existir doenças lisossômicas que apresentam a mesma deficiência enzimática e são entidades clinicamente distintas como, por exemplo, a Gangliosidose GM1 e a Mucopolissacaridose tipo IVB (MPS IV B).

As conseqüências celulares do acúmulo do substrato são determinadas por vários fatores: 1) tipo de material armazenado; 2) quantidade do acúmulo; 3) tipo celular que contém o depósito; 4) processos celulares envolvidos, tais como o tráfego intracelular, a autofagia e a transdução de sinais (BALLABIO; GIESELMANN, 2009).

2.2 AS MUCOPOLISSACARIDOSES

As MPS são um grupo de DLDs caracterizadas pela atividade reduzida de enzimas responsáveis pela degradação dos GAGs. O acúmulo dos GAGs não degradados ou parcialmente degradados ocorre nas células, tecidos e órgãos levando ao conjunto de sinais e sintomas que os pacientes apresentam. Esses substratos serão excretados em quantidades aumentadas na urina. As MPS são classificadas de acordo com o(s) tipo(s) de GAGs excretado(s) e com a deficiência enzimática envolvida. Existem onze deficiências enzimáticas para sete subtipos de MPS (Quadro 1) (NEUFELD; MUENZER, 2001).

Os GAGs são constituintes da superfície das células e da matriz extracelular, constituindo-se de polissacarídeos sulfatados formados de resíduos alternados de ácido urônico L-urônico e/ou D-glicurônico) e de hexosamina (D-galactosamina) (NEUFELD; MUENZER, 2001). Ao todo existem sete tipos de GAGs, classificados de acordo com a sua estrutura bioquímica em: sulfato de heparan e sulfato de dermatan, sulfato de condroitin I e II, ácido hialurônico, heparina e sulfato de queratan.

As MPS são doenças raras, apresentando incidência diversa entre países, a qual pode variar de 1,9 a 4,5:100,000 em recém-nascidos vivos (MEIKLE *et al.*, 1999; POORTHUIS *et al.*, 1999; APPLGARTH *et al.*, 2000; NELSON *et al.*, 2003; BAEHNER *et al.*, 2005).

Quadro 1. As Mucopolissacaridoses

MPS/ Epônimo	Deficiência enzimática	Gene/Locus	GAGs excretados em maior quantidade na urina
I Síndromes de Hurler, Hurler-Scheie e Scheie	α -L-iduronidase	<i>IDUA</i> / 4p16.3	Sulfato de heparan Sulfato de dermatan
II Síndrome de Hunter	Iduronato-2-sulfatase	<i>IDS</i> / Xq28	Sulfato de heparan Sulfato de dermatan
III A Síndrome de Sanfilippo A	Heparan N-sulfatase	<i>SGSH</i> / 17q25.3	Sulfato de heparan
IIIB Síndrome de Sanfilippo B	α -N-acetil-glicosaminidase	<i>NAGLU</i> / 17q21	Sulfato de heparan
IIIC Síndrome de Sanfilippo C	Acetil-CoA: α -glicosaminidase-N-acetiltransferase	<i>HGSNAT</i> /8p11.1	Sulfato de heparan
IIID Síndrome de Sanfilippo D	N-acetilglicosaminidase-6-sulfatase	<i>GNS</i> / 12q14	Sulfato de heparan
IVA Síndrome de Morquio A	N-acetil-galactosamina-6-sulfatase	<i>GALNS</i> / 16q24.3	Sulfato de condroitin Sulfato de queratan
IVB Síndrome de Morquio B	β -galactosidase	<i>GLB1</i> / 3p21-33	Sulfato de condroitin Sulfato de queratan
VI Síndrome de Maroteaux-Lamy	N-acetil-galactosamina-4-sulfatase	<i>ARSB</i> / 5q11-13	Sulfato de dermatan Sulfato de condroitin
VII Síndrome de Sly	β -glicuronidase	<i>GUSB</i> 7q21.1	Sulfato de dermatan Sulfato de heparan Sulfato de condroitin
IX Síndrome de Natowicz	Hialuronidase	<i>HYAL1</i> 3p21.3-21.2	Ácido hialurônico

[Adaptada de Neufeuil e Muenzer (2001)]

A Rede MPS Brasil, uma iniciativa para promoção do diagnóstico das MPS em nosso país coordenada pelo Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto

Alegre (SGM-HCPA) tem um total de 796 pacientes brasileiros com MPS cadastrados desde 2004 até junho de 2009, sendo 177 com MPS I, 217 com MPS II, 110 com MPS III (MPS IIIA: 26; MPS IIIB: 55; MPS IIIC: 29; MPS IIID: 0), 100 com MPS IV (MPS IV-A: 91 e MPS IV-B: 09); 182 com MPS VI; e 10 com MPS VII.

As MPS são caracterizadas fenotipicamente pela presença de: face grosseira, contraturas articulares, hepatoesplenomegalia, disostose múltipla, surdez, opacificação de córnea, diarreia, cardiopatia, doença pulmonar obstrutiva crônica, apnéia do sono e retardo mental (NEUFELD; MUENZER, 2001).

Os quadros clínicos são crônicos e progressivos. O diagnóstico preciso de qual tipo específico de MPS é difícil e às vezes até impossível de ser realizado somente pelo exame clínico.

A partir da suspeita clínica, o diagnóstico das MPS é estabelecido através da realização de exames bioquímicos específicos (Figura 1). Na maioria, das vezes a suspeita diagnóstica não é específica para um tipo de MPS e, então, o primeiro exame realizado é a análise dos GAGs na urina através de dosagem e de cromatografia (ou eletroforese). Esses exames iniciais permitem orientar a direção dos estudos enzimáticos. A maioria das MPS pode ser triada por esses métodos, mas somente a medida da atividade da enzima específica permitirá o diagnóstico definitivo do tipo de MPS (NEUFELD; MUENZER, 2001).

2.2.1 A MUCOPOLISSACARIDOSE TIPO II (SÍNDROME DE HUNTER)

A MPS II (MIM 309900) foi descrita pela primeira vez por Charles Hunter em

1917. Os pacientes, além da deficiência da iduronato-2-sulfatase (IDS; EC 3.1.6.13), apresentam excreção urinária aumentada, em níveis variáveis, dos GAGs sulfato de heparan e sulfato de dermatan.

A incidência da MPS II tem se situado entre 1:110,000 e 1:320,000 em recém nascido vivos (YOUNG; HARPER, 1982; MACHILL *et al.*, 1991; NELSON *et al.*, 1997; MEIKLE *et al.*, 1999; POORTHUIS *et al.*, 1999; APPLGARTH *et al.*, 2000; NELSON *et al.*, 2003; BAEHNER *et al.*, 2005). Em Israel, parece haver uma maior incidência (SCHAAP; BACH, 1980), em torno de 1:68,000 em recém nascidos vivos; possíveis explicações para este achado seriam a existência de vantagem seletiva para as heterozigotas (SCHAPP; BACH, 1980) ou deriva genética (CHAKRAVATTI; BALE, 1983). Em termos de frequência relativa, a MPS II parecer ser o tipo de MPS mais freqüente em Taiwan e no norte da Ásia (LIN *et al.*, 2006). No Brasil, não temos dados epidemiológicos a respeito da incidência da MPS II, mas de acordo com os resultados da Rede MPS Brasil ela é a MPS mais freqüentemente diagnosticada (REDE MPS).

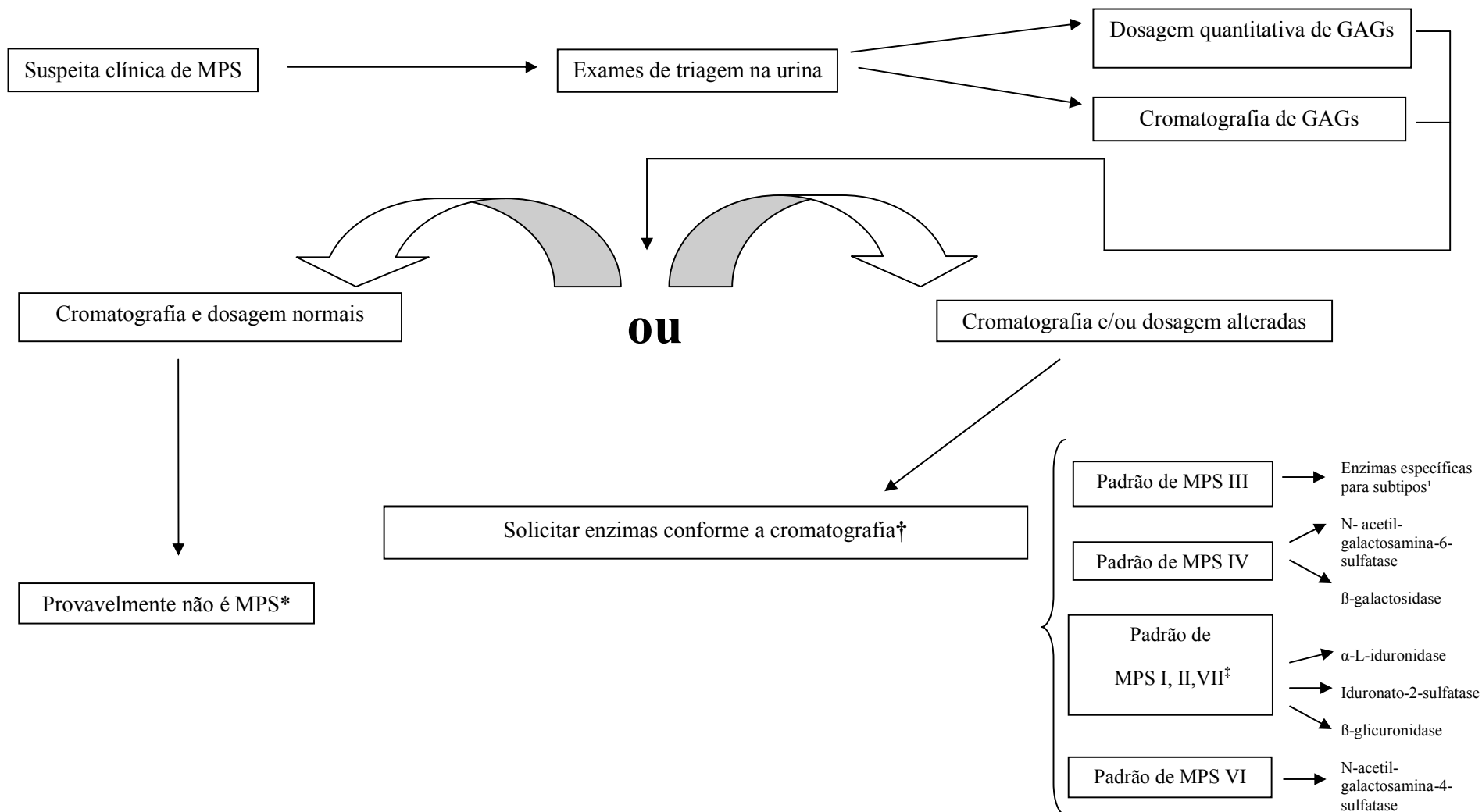


Figura 1. Fluxograma para o diagnóstico das MPS (Adaptado da Rede MPS Brasil)

*nas MPS III e MPS IV os exames urinários podem ser normais. Nos demais tipos de MPS, isto ocorre de forma menos freqüente. No entanto, a investigação deve ser continuada caso a suspeita clínica seja muito forte.

†medir sempre mais de uma enzima de referência; se uma sulfatase estiver deficiente medir pelo menos outra sulfatase.

‡ na MPS VII pode excretar sulfato de condroitin em quantidades aumentadas na urina

MPS (mucopolissacaridoses), GAGs (glicosaminoglicanos)

Enzimas específicas para subtipos¹: Heparan N-sulfatase (MPS IIIA), α-N-acetil- glicosaminidase (MPS IIIB), Acetil-CoA: α- glicosaminidase-N-acetiltransferase (MPS IIIC) e N-acetilglicosaminidase-6-sulfatase (MPS IIID).

2.2.1.1 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DA MPS II

Os pacientes com MPS II possuem manifestações clínicas semelhantes às demais MPS, como por exemplo, hepatomegalia associada ou não à esplenomegalia (WRAITH *et al.*, 2008). No entanto, algumas características podem ser encontradas mais especificamente na MPS II. Alguns pacientes podem apresentar lesões de pele conhecidas como lesões papulares esbranquiçadas, que se distribuem principalmente e de modo simétrico nas escápulas, nas linhas axilares posteriores, no tórax, na região cervical e nos membros superiores (DEMITSU *et al.*, 1999; KNOEL; TUNNESTEN, 2000).

Um diferencial em relação às MPS I e VI é a ausência de opacificação de córnea nos portadores de MPS II. Além disso, a MPS II, acomete quase que exclusivamente pacientes do sexo masculino (YOUNG *et al.*, 1982a; YOUNG *et al.*, 1982b; YOUNG; HARPER, 1982; YOUNG; HARPER, 1983; MUENZER, 1986; NEUFELD; MUENZER, 2001; OMIM, 2009).

Os pacientes com MPS II são classificados em forma grave/neuronopata e atenuada/não neuronopata, de acordo com a presença de regressão neurológica. Ambas as formas encontram-se abaixo sumarizadas:

a) a forma grave (MPS IIA) – é a forma mais freqüente, detectada clinicamente ao redor dos dois anos de idade, sendo caracterizada por face grosseira, baixa estatura, disostose múltipla, surdez, hepatoesplenomegalia, deterioração mental progressiva e morte ao redor da segunda década de vida;

b) a forma atenuada (MPS IIB) - caracterizada por se manifestar mais tardiamente, com leve ou nenhum retardo mental (YOUNG, 1982a). As demais manifestações clínicas se distribuem de modo variável entre os pacientes. Há relatos de pacientes sobrevivendo até a quinta ou sexta década (WRAITH *et al.*, 2008).

Ainda em relação às alterações neurológicas, os pacientes podem também apresentar comprometimento periférico (síndrome do túnel do carpo, por exemplo) (SANJURIJO-CRESPO, 2007; MARTIN *et al.*, 2008; WRAITH *et al.*, 2008) e lesões no sistema nervoso central (SANJURIJO-CRESPO, 2007; MARTIN *et al.*, 2008; WRAITH *et al.*, 2008). Os pacientes com MPS II parecem apresentar um maior grau de atrofia cerebral e de hidrocefalia do que as das demais MPS. As lesões na substância branca estão difusamente distribuídas e geralmente afetam mais de três lobos cerebrais (VEDOLIN *et al.*, 2007). A ocorrência de síndrome de compressão medular também já foi relatada (MARTIN *et al.*, 2008).

As manifestações ósseas não são específicas dos pacientes com MPS II, e o conjunto das manifestações ósseas é chamado de disostose múltipla. Entre as alterações que podem ser encontradas figuram macrocefalia, sela túrcica em J, redução do diâmetro ântero-posterior das vértebras, coxa valga, irregularidade da diáfise dos ossos longos e displasia da epífise dos ossos tubulares curtos (MARTIN *et al.*, 2008).

As principais causas de morte estão relacionadas às complicações respiratórias (JONES *et al.*, 2009). Entretanto, outras causas também são relatadas como: morte súbita, caquexia, cardiomiopatia, hemorragias durante procedimentos cirúrgicos e aspiração, entre outras causas (SCHWARTZ *et al.*, 2007; JONES *et al.*, 2009).

2.2.1.2 DIAGNÓSTICO DOS PACIENTES COM MPS II

O diagnóstico laboratorial de um paciente com MPS II é baseado na suspeita clínica. Na prática, quando se trata de um caso único na família, raramente esse diagnóstico é suscitado diretamente. Os exames laboratoriais, geralmente, seguem os passos apresentados na Figura 1.

2.2.1.3 MANEJO DOS PACIENTES COM MPS II

Os principais tratamentos são focados na prevenção e manejo dos sinais e sintomas da doença (MARTIN *et al.*, 2008; WRAITH *et al.*, 2008). Cirurgias são muito comuns nos pacientes com MPS II, e as mais frequentemente realizadas são: herniorrafias inguinais e umbilicais, adenoidectomia, amigdalectomia, colocação de tubos de ventilação, correção da síndrome do túnel do carpo, derivação ventrículo peritoneal, entre outras (NEUFELD; MUENZER, 2001; MARTIN *et al.*, 2008; VIEIRA *et al.*, 2008). Devido aos riscos anestésicos que eles apresentam, devem ser tomadas medidas que possam minimizar os riscos e prevenir as complicações no pós-operatório (MARTIN *et al.*, 2008; WRAITH *et al.*, 2008). Idealmente os pacientes devem ser operados somente em centros especializados para esse tipo de patologia (WRAITH *et al.*, 2008).

Em relação ao tratamento específico, várias tentativas de reposição da enzima deficiente já foram descritas na literatura: transplante de medula óssea (BERGSTROM *et*

al., 1994; MARTIN *et al.*, 2008), implantação de membrana amniótica humana, (MUENZER *et al.*, 1992; MARTIN *et al.*, 2008), transplante de fibroblastos, infusão de soro ou plasma, infusão de leucócitos (MARTIN *et al.*, 2008), terapia gênica (STRONCEK *et al.*, 1999; TOMANIN *et al.*, 2002; CARDONE *et al.*, 2006; MARTIN *et al.*, 2008), implantação intraperitoneal de mioblastos superexpressando IDS (FRISO *et al.*, 2005; MARTIN *et al.*, 2008), e a terapia de reposição enzimática (TRE) (MUENZER *et al.*, 2006; MUENZER *et al.*, 2007; MARTIN *et al.*, 2008). Dentre esses tratamentos, somente a TRE, com a enzima recombinante idursulfase, foi testada em ensaios clínicos randomizados (MARTIN *et al.*, 2008). Com a TRE, levanta-se a possibilidade de reduzir os danos decorrentes do acúmulo de GAGs e diminuir ou até prevenir a progressão da doença nos órgãos e tecidos afetados (WRAITH *et al.*, 2008).

A TRE é um tratamento novo que pode ajudar muitos pacientes se iniciado precocemente. O maior desafio ainda é o tratamento da doença do sistema nervoso central, tendo em vista que a enzima não ultrapassa a barreira hematoencefálica. Outros métodos de tratamento que possibilitem a chegada da enzima ao cérebro necessitam ser desenvolvidos. Para a MPS II, ainda não existem estudos com a administração direta da enzima no líquido cefalorraquidiano ou nos ventrículos. Talvez a combinação com outras terapias como terapias baseadas em células, incluindo o aumento da expressão gênica ou a sua reposição, possam ser úteis no tratamento da doença neurológica (WRAITH *et al.*, 2008).

Até o momento, não está claro se o transplante de medula óssea ou de células de cordão umbilical são realmente efetivos na MPS II (COPA *et al.*, 1995; VELLODI *et al.*, 1999; PETERS *et al.*, 2000; NEUFELD; MUENZER, 2001; MUENZER *et al.*, 2006; MARTIN *et al.*, 2008; WRATIH *et al.*, 2008). As evidências são fracas, existindo somente

relatos de casos na literatura e não estudos sistemáticos e controlados (PETERS *et al.*, 2000; MUENZER *et al.*, 2006; MARTIN *et al.*, 2008).

Estudos com terapia gênica estão em fase pré-clínica, mostrando resultados promissores até o momento (STRONCEK *et al.*, 1999; TOMANIN *et al.*, 2002; SLEEPER *et al.*, 2004; CARDONE *et al.*, 2006; MARTIN *et al.*, 2008; ZAREBA, 2007; WRAITH *et al.*, 2008).

As crianças com MPS II necessitam ser inseridas precocemente em um ambiente com estímulo educacional para permitir o melhor desenvolvimento adequado de suas potencialidades. O manejo adequado desses pacientes exige uma equipe multidisciplinar com avaliações periódicas que serão determinadas de acordo com a necessidade individual, principalmente nos casos de maior gravidade. O tratamento das complicações da doença pode melhorar a qualidade de vida dos pacientes. Nesse sentido, o diagnóstico precoce é essencial (WRAITH *et al.*, 2008). O contato com outros pacientes com a mesma doença e o apoio dos grupos de suporte, juntamente com o aconselhamento genético, devem fazer parte do manejo dos pacientes com MPS II e de suas famílias.

2.2.1.4 DIAGNÓSTICO PRÉ-NATAL NA MPS II

Em relação ao diagnóstico pré-natal, a medida da atividade de IDS pode ser realizada em biópsia de vilosidade coriônica e em células do líquido amniótico (NEUFELD; MUENZER, 2001; KEULEMANS *et al.*, 2002). Também é possível fazer a análise qualitativa e quantitativa de GAGs no líquido amniótico (NEUFELD; MUENZER, 2001; KEULEMANS *et al.*, 2002). Segundo, Zlotogora e Bach (1986) a dosagem da

atividade da IDS em grávidas de fetos masculinos com MPS II tem valores mais baixos do que mulheres grávidas na população em geral.

O diagnóstico de certeza é idealmente baseado na análise da mutação, previamente identificada no caso índice, no DNA fetal para a confirmação ou exclusão do diagnóstico de MPS II (LAKE *et al.*, 1998).

Por outro lado, a dosagem bioquímica da IDS deve ser realizada somente em fetos do sexo masculinos devido às diretrizes para a realização de aconselhamento genético (FRYER, 2000). Então está indicado nesses casos de doenças de herança ligada ao cromossomo X a realização de sexagem fetal anterior à dosagem enzimática (KEULEMANS *et al.*, 2002).

2.2.1.5 A ENZIMA IDS

A IDS é uma glicoproteína monomérica composta por 550 aminoácidos e 8 sítios potenciais de glicosilação. A função principal dessa enzima é de remover o grupo sulfato da posição 2 do ácido L-idurônico presente no sulfato de dermatan e no sulfato de heparan (BOND *et al.*, 1997). Em indivíduos saudáveis a IDS está presente no plasma e em todos os tecidos, inclusive em células amnióticas e coriônicas (LIEBAERS; NEUFELD, 1976; DEAN, 1983).

O diagnóstico diferencial deve ser realizado não somente entre as MPS, mas também com algumas das outras doenças lisossômicas, o que clinicamente nem sempre é possível, exigindo exames complementares e medida das atividades enzimáticas

específicas. A possibilidade da deficiência múltipla de sulfatases também deve ser considerada quando se encontra a deficiência de uma sulfatase isolada como, por exemplo, a de IDS.

Esta distinção pode ser feita pela medida da atividade de outra sulfatase como, por exemplo, a arilsulfatase A, que estaria normal no caso da MPS II (deficiência isolada de IDS) e diminuída na deficiência múltipla de sulfatases.

2.2.1.6 O GENE *IDS*

O gene *IDS* está no cromossomo Xq28 (Figura 2) e possui 9 éxons englobando 24kb (WILSON *et al.*, 1993; OMIM, 2009). O cDNA de 2.3kb codifica um polipeptídeo de 550 aminoácidos incluindo uma seqüência sinal de 25 aminoácidos (WILSON *et al.*, 1990). Também existe um pseudogene formado por seqüências homólogas aos éxons 2 e 3 e ao íntron 7, que está localizado aproximadamente a 20kb do gene ativo.

Até julho de 2009 tinham sido identificadas 332 mutações sendo a maioria mutações sem sentido ou de sentido trocado (HGMD, 2009; KIM *et al.*, 2003; CHANG *et al.*, 2005). Apesar das mutações estarem distribuídas de forma randômica, existe uma alta proporção de mutações de ponto localizadas nos éxons 3, 8 e 9 (RATHMANN *et al.*, 1996; TIMMS *et al.*, 1998). A análise de haplótipos revelou que essas mutações ocorrem mais freqüentemente na meiose masculina (RATHMANN *et al.*, 1996; FROISSART *et al.*, 1998; LIN *et al.*, 2006).

2.2.1.7 ASSOCIAÇÃO GENÓTIPO-FENÓTIPO NA MPS II

Em 20 a 25% dos pacientes com MPS II são encontradas deleções parciais ou totais e rearranjos do gene da *IDS* (TIMMS *et al.*, 1997; LIN *et al.*, 2006). A deleção total quase sempre leva ao fenótipo mais grave e às vezes atípico por envolver outros genes adjacentes como, por exemplo, o gene *FMR2* (TIMMS *et al.*, 1997). Um fenótipo mais grave também tem sido descrito nos pacientes com recombinação homóloga entre o gene da *IDS* e o seu pseudogene (TIMMS *et al.*, 1997). Entretanto, até o presente momento, não é possível realizar uma correlação genótipo-fenótipo em todos os casos (GIESELMANN, 1995; LI *et al.*, 1999). Alguns pacientes mesmo com níveis enzimáticos extremamente reduzidos podem apresentar fenótipos mais leves, o que sugere que outros fatores genéticos ou epigenéticos possam contribuir para o fenótipo (SCHWARTZ, 2004).

Dessa forma, a identificação das mutações, na maioria dos casos, acaba não sendo útil para predizer o fenótipo. Também deve ser frisado o fato de que a expressão do defeito enzimático pode ser diferente nos diversos tecidos e os resultados *in vitro* podem não ser reprodutíveis *in vivo* (GIESELMANN, 1995).

Estudos adicionais de associação genótipo-fenótipo são necessários para um melhor entendimento do prognóstico e da escolha das possíveis intervenções terapêuticas (CHANG *et al.*, 2005; SUKEGAWA *et al.*, 2006).

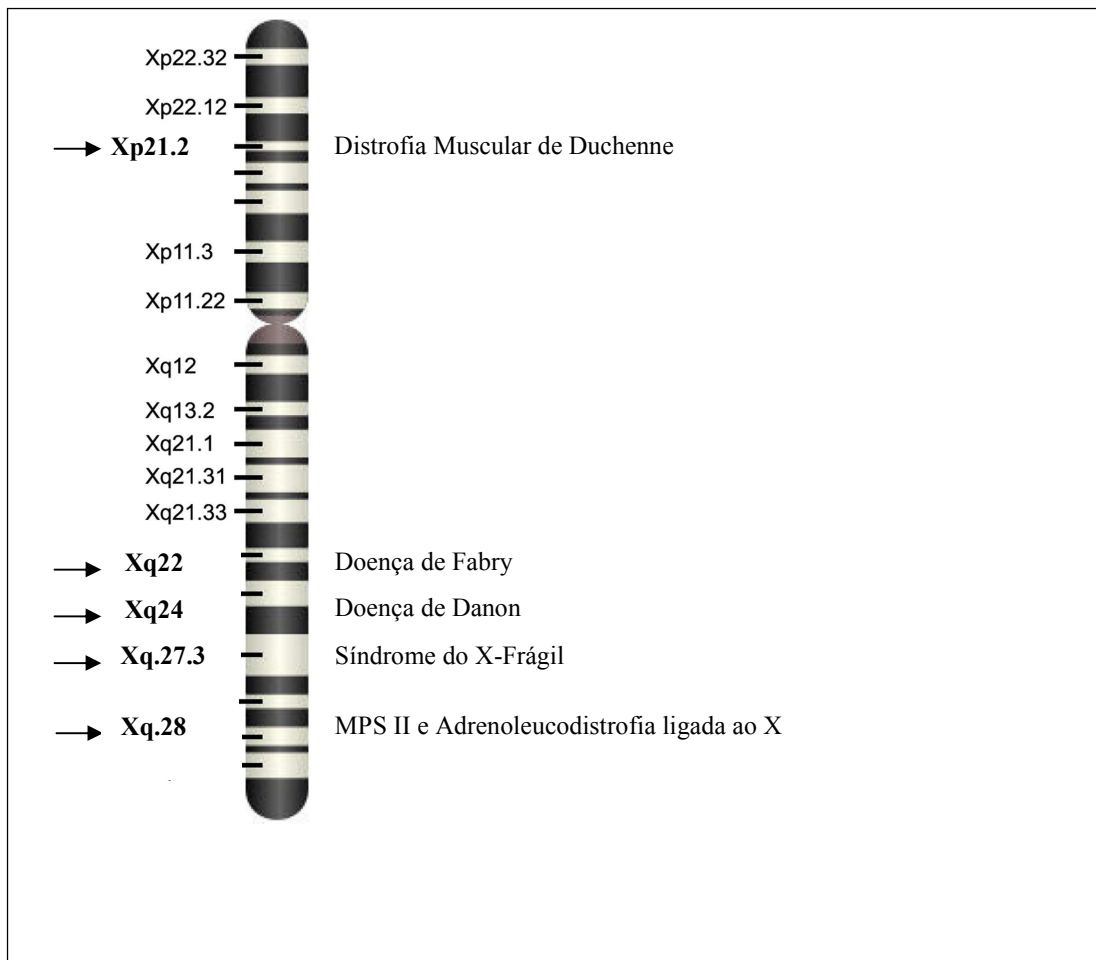


Figura 2. Localização dos genes em algumas doenças que apresentam herança ligada ao cromossomo X (Adaptada de *National Library of Medicine*).

2.2.1.8 DETECÇÃO DE HETEROZIGOTAS PARA MPS II

Segundo Neufeld e Muenzer (2001), após a solicitação de tratamento, o diagnóstico de heterozigotos/heterozigotas é o segundo pedido mais freqüentemente solicitado pelas famílias com MPS (SCHWARTZ, 2004), sendo, portanto, de suma importância para as famílias com MPS II a identificação das mulheres em risco de serem heterozigotas.

Uma mulher é considerada heterozigota obrigatória para MPS II se preenche algum dos seguintes critérios: 1) ser mãe de um indivíduo afetado e apresentar história familiar

positiva (ou seja, outro familiar também afetado por MPS II), desde que o heredograma seja compatível com herança ligada ao cromossomo X; 2) ser uma mãe de pelo menos dois indivíduos com MPS II; 3) ter mutação patogênica identificada em um dos alelos do gene *IDS*.

A realização de aconselhamento genético em uma família na qual a mãe não preenche os critérios acima relacionados para ser heterozigota obrigatória (ou porque a história familiar não é informativa, ou porque ela não pôde ser submetida à análise do gene *IDS*), não é uma tarefa fácil. De acordo com o Equilíbrio de *Hardy-Weinberg*, e considerando genes letais ligados ao cromossomo X, é estimado que 2/3 das mulheres mães de casos isolados de MPS II sejam heterozigotas (HALDANE, 1935). Entretanto, estudos em famílias com MPS II (MACHILL *et al.*, 1991; BUNGE *et al.*, 1994; FROSSAIRT *et al.*, 1997) encontraram uma proporção de heterozigotas superior à esperada, ao redor de 78-93%. As explicações possíveis para esse achado seriam: 1) as mutações teriam surgimento preferencial na espermatogênese (RATHMANN *et al.*, 1996) ou 2) a seleção da amostra de mulheres investigadas pode não ter sido aleatória ou ter sido realizada de forma pouco adequada (por exemplo, podem ter sido incluídas, na análise, mulheres que tinham um filho e um irmão com MPS II), contribuindo, então, para um viés nos resultados.

2.2.1.8.1 MÉTODOS DE IDENTIFICAÇÃO DE HETEROZIGOTAS PARA MPS II

Ao longo dos anos vários métodos de identificação de heterozigotas foram desenvolvidos (Quadro 2) e foram subseqüentemente abandonados em prol do teste considerado hoje padrão-ouro (identificação da presença de mutações patogênicas no gene

IDS). Todas essas técnicas mais antigas utilizavam material que necessitava estar em cultura, sendo dispendiosas e consumindo muito tempo para a obtenção de resultados. Além disso, independentemente do tecido estudado, da técnica, e do substrato pesquisado, geralmente nem todas as possíveis heterozigotas eram identificadas (ADINOLFI, 1993).

As primeiras técnicas utilizadas para a medida da *IDS* em soro e plasma foram desapontadoras por identificarem somente ao redor de 50% das possíveis heterozigotas (LIEBAERS; NEUFELD, 1976; ARCHER *et al.*, 1981; ARCHER *et al.*, 1982; ARCHER *et al.*, 1983). Trabalhos posteriores (ZLOGOTORA; BACH 1984; SCHRODER *et al.*, 1993) discriminaram heterozigotas em até aproximadamente 86% dos casos através das dosagens de *IDS* em soro e linfócitos. No entanto, a identificação das heterozigotas para *MPS II* é mais confiável quando a dosagem da atividade enzimática for realizada em leucócitos (SCHWARTZ, 2004) e também mais sensível quanto mais baixa estiver a atividade enzimática (NEUFELD; MUENZER, 2001).

Embora 10% das heterozigotas para *MPS II* possam não ser identificadas por esses métodos em soro e linfócitos, falsos positivos, por outro lado, não foram até o momento descritos (dados não publicados SCHRODER *et al.*, 1993).

Quadro 2. Métodos de identificação de heterozigotas para MPS II

Autor	Método	Resultados verdadeiro-positivos
DANES; BEARN, 1967	Análise clonal de fibroblastos através da medida do acúmulo intracelular de GAGse e identificação de metacromasia celular (Método de Wessler e Método de Carbazol)	72%
NWOKORO; NEUFELD, 1979	Razão entre atividades da IDS e beta-hexosaminidase em bulbos capilares (Método radioativo)	7/8 (87,5%)
BOOTH; NADLER, 1974	Análise clonal de fibroblastos em mistura de células naturais e artificiais após congelamento e cultura prolongada medindo a incorporação de sulfato radioativo (Medida de pH)	5/5 (100%)
DONNELLY; DI FERRANTE, 1975	Análise de cultura de fibroblastos em mistura de células naturais e artificiais medindo a incorporação de sulfato radioativo pré e pós congelamento (Método radioativo)	2/3 (66,6%)
CAPOBIANCHI; ROMEO, 1976	Medida da incorporação sulfoiduronato em clones de fibroblastos (Método radioativo)	2/2 (100%)
MIGEON <i>et al.</i> , 1977	Medida da incorporação sulfoiduronato em clones de fibroblastos (Método radioativo)	1/1 (100%)
YUTAKA <i>et al.</i> , 1978	Medida da atividade da IDS por método radioisótopo em combinação através da medida da desulfatação e incubação estendida em bulbos capilares e de IDS em leucócitos e plasma. (Método radioativo)	1/1 (100%)
ARCHER <i>et al.</i> , 1981	Medida da atividade da IDS em soro (Cromatografia de troca iônica em papel)	11/11 (100%)
TONNENSEN <i>et al.</i> , 1983	Taxa de incorporação de sulfato radioativo dentro dos fibroblastos na presença de frutose-1-fosfato, e diferença da incorporação na presença e na ausência de frutose-1-fosfato (Método radioativo)	24/25 (96%)
TONNENSEN <i>et al.</i> , 1984	Taxa de incorporação de sulfato radioativo dentro dos fibroblastos na presença de frutose-1-fosfato, e diferença da incorporação na presença e na ausência de frutose-1-fosfato (Método radioativo)	14/15 (93%)
ZLOGOTORA; BACH, 1984	Dosagem da IDS em soro e linfócitos (Método de Hall)	13/15 (86,6%)
CHASE <i>et al.</i> , 1986	Razão entre atividades da IDS e β -hexosaminidase em bulbos capilares (Método radioativo)	5/5 (100%)

* número de heterozigotas confirmadas/número de heterozigotas totais.

Adicionalmente, é esperado que as heterozigotas para MPS II apresentem aproximadamente 50% de atividade da IDS à encontrada em mulheres não heterozigotas (SCHWARTZ, 2004), mas isso nem sempre ocorre devido às seguintes possibilidades: 1) a inativação do cromossomo X pode não ser randômica; 2) pode haver sobrevivência preferencial das células com determinado cromossomo X ativo; 3) a IDS pode ser endocitada pelas células que produzem essa enzima em quantidade insuficiente (ADINOLFI, 1993).

A partir de 1990, com a clonagem do gene *IDS* (WILSON *et al.*, 1990), vários métodos foram desenvolvidos para que fossem identificadas as alterações do DNA envolvidas na patogênese da doença (STONE; ADINOLFI, 1992; ADINOLFI, 1993). Na maioria dos casos, a alteração molecular não era identificada somente por *Southern Blot* e nessas famílias era necessário realizar outras técnicas como o uso dos *Restriction fragment length polymorphisms (RFLPs)* próximas ao sítio da mutação. A confiabilidade desse teste estava baseada no fato de que a chance de recombinação entre os sítios da mutação e os *RFLPs* era baixa (SCHRODER *et al.*, 1993).

2.3 O CROMOSSOMO X

O cromossomo X em mamíferos consiste em aproximadamente 100Mb de DNA e parece conter 1400 genes (OMIN, 2009). Somente 1,7% dos genes localizados no cromossomo X codificam proteínas sendo o restante formado por seqüências não

codificantes, introns, pseudogenes e RNA (ROSS *et al.*, 2005). São conhecidos 208 fenótipos com base molecular conhecida que apresentam padrão de herança ligado ao cromossomo X (OMIM, 2009).

2.4 CLASSIFICAÇÃO DAS DOENÇAS LIGADAS AO CROMOSSOMO X

As doenças de herança ligadas ao cromossomo X tradicionalmente podem ser classificadas em recessivas ou dominantes (Quadro 3), sendo que maioria delas é classificada como de herança ligada ao cromossomo X recessiva.

As doenças que apresentam herança dominante ligada ao cromossomo X ocorrem preferencialmente em mulheres. Nessas doenças uma expressividade variável inter e intra familiar podem ser verificadas (HEDERA; GORSKI, 2003; MORLEO; FRANCO, 2008). Nas doenças ligadas ao cromossomo X dominante o fenótipo parece ser influenciado pelo desvio da inativação do cromossomo X e pelos níveis de expressão dos transcritos ligados ao cromossomo X (MORLEO; FRANCO, 2008).

No entanto, tem sido proposta uma revisão nas regras tradicionais para a classificação das doenças ligadas ao cromossomo X, evitando-se a divisão em doenças recessivas e dominantes (DOBYNS *et al.*, 2004).

Os principais fatores envolvidos na heterogeneidade clínica das doenças ligadas ao cromossomo X são: a redução da penetrância, a expressividade variável, o mecanismo de inativação do cromossomo X e o tipo de produto gênico envolvido (MIGEON, 2007).

Quadro 3. Classificação tradicional das doenças ligadas ao cromossomo X *

Tipo de herança ligada ao cromossomo X	Características principais	Exemplos
Recessiva	<p>Afeta quase que exclusivamente o sexo masculino</p> <p>A incidência é mais alta nos homens que nas mulheres</p> <p>As mulheres geralmente não são afetadas, mas a expressividade é variável podendo ser determinada pelo padrão de inativação do cromossomo X</p> <p>As mulheres podem apresentar um fenótipo mais brando, mas geralmente também mais variável</p> <p>A transmissão ocorre através de heterozigotas mulheres não afetadas ou afetadas para seus filhos homens</p> <p>Não ocorre transmissão do sexo masculino para o sexo masculino</p> <p>Homens têm risco de transmitir a doença para o netos através das heterozigotas obrigatórias</p> <p>Uma proporção significativa de casos novos é devido à mutação nova</p>	<p>Distrofia Muscular de Duchenne</p> <p>Mucopolissacaridose tipo II</p> <p>Hemofilia A</p>
Dominante	<p>Filhas de homens afetados sempre herdam a doença</p> <p>Filhos de homens afetados não herdam a doença dos seus pais</p> <p>Heterozigotas afetadas podem transmitir aos filhos de ambos os sexos</p> <p>Para fenótipo raros as mulheres afetadas são cerca de duas vezes mais comumente acometidas</p> <p>As mulheres podem apresentar um fenótipo mais brando, mas geralmente também mais heterogêneo</p> <p>Pode ser observado um excesso de mulheres afetadas na história familiar</p>	<p>Raquitismo hipofosfatêmico</p> <p>Incontinência pigmentar tipo 2</p>

*Adaptada de Dobyns *et al.*, (2004) e Nussbaum *et al.*, (2008)

2.5 A INATIVAÇÃO DO CROMOSSOMO X

2.5.1 HISTÓRICO DAS PESQUISAS DA INATIVAÇÃO DO CROMOSSOMO X

Em 1949, Barr e Bertram (DAVIDSON *et al.*, 1963) descreveram uma estrutura que denominaram de “satélite nucleolar”, sendo visível sob a luz de microscópio no núcleo de células fêmeas, mas não no de machos de várias espécies de animais. Essa identificação inicial foi devida ao fato dessa estrutura estar próxima ao núcleo, mas, logo após, foi chamada de cromatina sexual ou corpúsculo de Barr. Mas somente em Ohno *et al.*, (1959) (OHNO, 1967) identificaram que essa estrutura era derivada de um dos cromossomos X de fêmeas.

Em 1961, Lyon descreveu experimentos para a expressão de genes ligados ao cromossomo X referentes à cor da pelagem em fêmeas de camundongos. A partir disso foi postulado que: 1) a cromatina sexual poderia ser herdada de modo paterno ou materno em diferentes células do mesmo animal e 2) a cromatina sexual seria geneticamente inativada (LYON 1961). A partir da observação do padrão em mosaico na pelagem das fêmeas de camundongos que eram ocasionadas por genes mutados ligados ao cromossomo X, Lyon criou a hipótese de que um dos cromossomos X estaria inativado de modo precoce no desenvolvimento embrionário (Figura 3). Na mesma época, Beutler *et al.*, (1962) confirmou a hipótese da inativação do cromossomo X através de experimento com o gene da glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD). Foi observado que nas mulheres normais a atividade enzimática não era duas vezes maior do que nos homens normais, mas sim com

valores semelhantes. Enquanto que, nas mulheres heterozigotas para a deficiência de G6PD, o mecanismo de compensação de dose resultava em valores de atividade intermediária em relação a dos homens normais.

A testagem moderna da clonalidade no cromossomo X iniciou com Beutler em 1967 (CHEN; PRCHAL 2007) através da hipótese de que mulheres inativavam um dos cromossomos X para que ocorresse o mecanismo de equalização da dose gênica entre os sexos.

Ohno, (1962) (CHEN; PRCHAL, 2007) incorporou ao mecanismo de inativação do cromossomo X o fato de ser randômico, levando esse conceito para a citogenética.

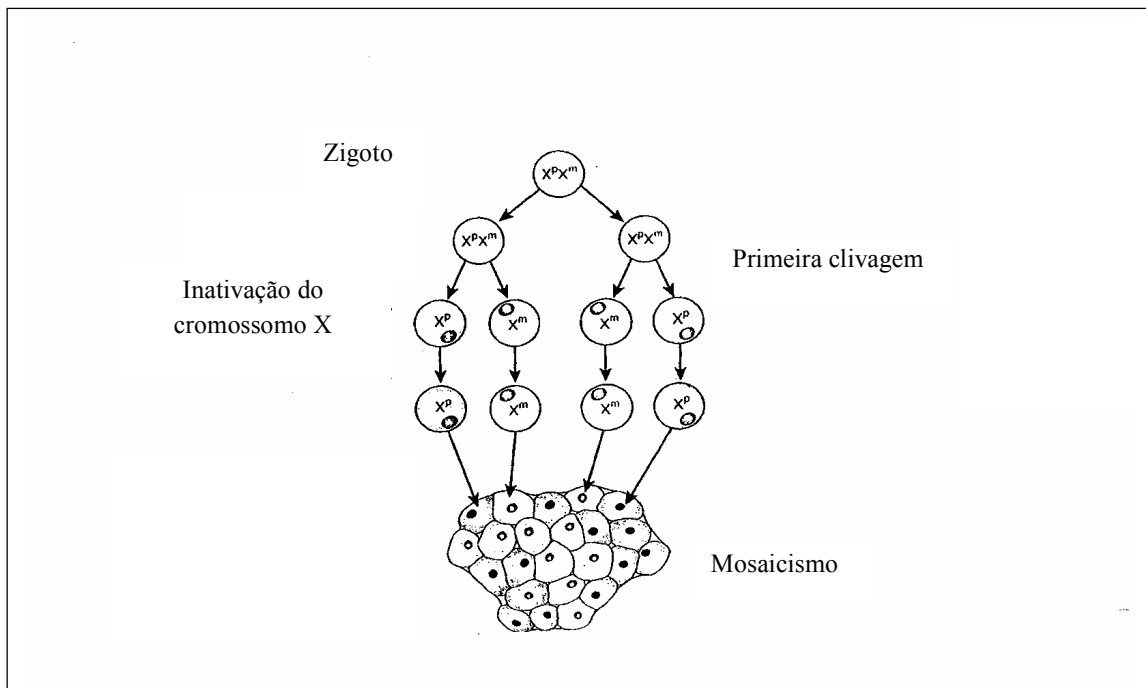


Figura 3. Hipótese de Lyon. A inativação do cromossomo X tem início precocemente no zigoto escolhendo de forma aleatória o cromossomo X materno ou paterno para ser inativado. A partir da escolha o cromossomo X paterno inativado (nessa ilustração) todas as suas células descendentes apresentarão o mesmo cromossomo [Adaptado de Nussbaum *et al.*, (2002)].

A regra conhecida como “n-1” para a contagem do número de cromossomos X que serão inativados determina que para cada conjunto celular diplóide em fêmeas humanas somente um cromossomo X será inativado (OHNO, 1967).

2.5.2 EVOLUÇÃO DO MECANISMO DE INATIVAÇÃO DO CROMOSSOMO X

A complexidade do mecanismo de inativação do cromossomo X dos animais, em relação às outras espécies que também utilizam deste mecanismo para a equalização da dosagem gênica, como a *D. melanogaster*, *M. musculus* e o *C. elegans*, está relacionada à evolução. No caso da *Drosophila*, a expressão do cromossomo X dos machos está em dobro em relação à das fêmeas, enquanto no *C. elegans*, as fêmeas têm uma expressão reduzida em relação à dos machos (LEWIN, 2001). Como a monossomia dos cromossomos geralmente é letal nos animais, atribui-se que alterações cromossômicas acumuladas durante o processo evolutivo tenham permitido que os machos tolerassem a presença de um único cromossomo X (HEARD; DISTECHE, 2006; MIGEON, 2006).

Os cromossomos sexuais teriam então evoluído de uma região homomórfica, de um par de cromossomos que progressivamente se tornou heteromórfica (DISTECHE, 1995) sendo que uma das evidências reside no fato de que o cromossomo Y possui um menor número de genes, cerca de 100 genes, enquanto o cromossomo X possui aproximadamente 1400 genes (ROSS *et al.*, 2005).

2.5.3 O MECANISMO DE INATIVAÇÃO DO CROMOSSOMO X

Em embriões de camundongos fêmeas pré-implantados, ambos os cromossomos X paterno e materno estão ativos. A inativação ocorre de modo diferencial nos tecidos extra-embrionários como o trofoderma e o endoderma primitivo do blastocisto e nas células da massa interna que darão origem ao embrião propriamente dito. Em todas as células de marsupiais e nos tecidos extra-embrionários de roedores, a inativação do cromossomo X está coordenada pelo mecanismo de *imprinting*, no qual o cromossomo X paterno é o que está sempre programado para ser inativado (SALIDO *et al.*, 1992; MARAHRENS *et al.*, 1997; BROCKORFF; TURNER, 2006; HEARD; DISTECHE, 2006; CHUVA DE SOUZA LOPES *et al.*, 2008). Nos tecidos extra-embrionários do trofoderma e nas células primitivas endodérmicas dessas espécies, o cromossomo X paterno está inativado; no entanto, ele é reativado na massa celular interna, que dará origem ao embrião propriamente dito. Embora existam evidências para a inativação preferencial do cromossomo X paterno em humanos nas células trofoblásticas (ROPERS *et al.*, 1978; HARRISON *et al.*, 1986; HARRISON, 1989; DANIELS *et al.*, 1997; GOTO *et al.*, 1997; GOTO *et al.*, 1998; MLYNARCZYK-EVANS *et al.*, 2006) outros estudos da inativação em vilosidades coriônicas demonstram que esse processo é randômico (MIGEON *et al.*, 1985; MOHANDAS *et al.*, 1989; LAU *et al.*, 1997; SHEN *et al.*, 2008), não existindo até o presente momento um consenso para a espécie humana.

O mecanismo de inativação do cromossomo X possibilita que tanto os níveis de expressão dos genes ligados ao cromossomo X como os autossomos sejam na verdade uma

mistura de genes herdados do pai e da mãe, sendo que a taxa esperada deve ser ao redor de 1:1 (HEARD, 2005; MIGEON, 2006; NGUYEN; DISTECHE, 2006).

O processo de compensação de dose nos mamíferos pode ser dividido em duas etapas: a primeira é a escolha de qual cromossomo X será ativo, o que é um mecanismo *trans*, e a segunda é o silenciamento de todo o cromossomo X, que é primariamente um mecanismo *cis*. A inativação *cis* é um mecanismo que realiza modificações no lócus ou na cromatina no mesmo cromossomo e se dispersa de modo seqüência específica por esse cromossomo, através de proteínas que são sintetizadas no citoplasma e entram no núcleo para regular outros genes. Por outro lado, no mecanismo *trans* o produto gênico é codificado em um cromossomo, mas a ação ocorre em outros *loci* ou, mais freqüentemente, em outro cromossomo, através da ligação ao DNA ou à cromatina (MOHANDAS *et al.*, 1987).

A inativação do cromossomo X em camundongos ocorre na final da fase de blastocisto (ao redor de 4 a 5 dias pós-fertilização) quando existem apenas duas células presentes (LYON, 1971; PUCK *et al.*, 1992; BELMONT, 1996; KAARE *et al.*, 2008). Em humanos, a inativação *cis* ocorre na gastrulação (na segunda semana após a fertilização) quando o embrião é composto de uma massa de células que dará origem aos três folhetos embrionários (MIGEON; KENNEDY, 1975; MIGEON, 2007; AVNER; HEARD, 2001).

Embora a inativação seja reconhecidamente um processo irreversível, a reativação do cromossomo X pode ser encontrada de forma programada nas células germinativas garantindo que o cromossomo X seja ativo novamente nos gametas (MAK *et al.*, 2004; OKAMOTO *et al.*, 2004; BROCKORFF; TURNER, 2006; MIGEON, 2007). Também

precocemente foi evidenciado que na placenta humana existe a possibilidade de reversão da inativação (MIGEON *et al.*, 2005). Também em tumores pode ocorrer a reativação de genes ligados ao cromossomo X (WAREHAN *et al.*, 1987; SPATZ *et al.*, 2004; HEARD; DISTECHE, 2006) sugerindo que esse processo esteja envolvido com a perda das “marcas epigenéticas” (HEARD; DISTECHE, 2006).

2.5.4 GENES ENVOLVIDOS NO MECANISMO DA INATIVAÇÃO DO CROMOSSOMO X

A inativação *cis* em camundongos parece ser dependente dos seguintes elementos: 1) *Xist* (*X inactivation-specific transcript*; OMIM 314670), localizado em Xq13.2, (BORSANI *et al.*, 1991); 2) *Xite* (*X inactivation intergenic transcription element*; OMIM 30074) (OGAWA; LEE, 2003) ou *Xce*, (*X chromosome-controlling element*; OMIM 30074) (CATTANACH; ISAACASON, 1967). *Xce*, está localizado a jusante de *Xist* (CHADWICK *et al.*, 2006) e 3) *Tsix*, localizado em Xq13.2, (*X inactivation-specific transcript-antisense*; OMIM 300181) (CHAO *et al.*, 2002). Além desses 3 elementos, existem pelo menos outros dois genes que também participam do mecanismo de inativação do cromossomo X: *Brx* e *Cdx4* (BROWN *et al.*, 1992; PENNY *et al.*, 1996; MARAHRENS *et al.*, 1997; LEE; LU, 1999; OGAWA; LEE, 2003; MONKHORST *et al.*, 2008).

O principal local de controle da inativação do cromossomo X é conhecido como *Xic* (Figura 4) (*X inactivation center*) estando localizado em Xq13.2 em humanos e na região D em camundongos (MIGEON, 2007) A partir do *Xic* a inativação é iniciada e se dispersará

de modo bidirecional ao longo do cromossomo X (RUSSEL, 1963). No entanto, *Xic* não é somente o local de controle da inativação do cromossomo X, mas ele também tem o importante papel de proteger o futuro cromossomo X ativo de ser silenciado (MIGEON, 2007).

Adicionalmente, novos elementos estão surgindo e que parecem ser fundamentais como o locus *DxPas34* que atua conjuntamente com o *Tsix* participando do controle da regulação da inativação e provavelmente do mecanismo de *imprinting* e da escolha do cromossomo X (AVNER; HEARD, 2001).

A inativação em *trans*, por sua vez, parece ser dependente de fatores de transcrição como o *CTCF* (fator de ligação-CCTC; OMIM 604167). O *CTCF*, localizado em 16q22.1, é uma proteína ubiquamente expressada como anéis de zinco envolvida na ativação e repressão transcricional a insuladores ligados à cromatina (OHLSSON *et al.*, 2001; CUDDAPAH, 2009) e que auxilia a maquinaria funcional de *Xic* em *trans* juntamente com o *Tsix*.

O gene *Xist* presente em camundongos já foi descrito em humanos (*XIST*) é expresso unicamente no cromossomo X inativo (BORSANI *et al.*, 1991; BROCKDORFF *et al.*, 1991; BROWN *et al.*, 1991; HERZING *et al.*, 1997) sendo composto de 17 kb. Devido ao fato de não apresentar fase aberta de leitura para a tradução de proteína atribui-se a ele a função de RNA. Ao todo são oito éxons apresentando também seqüências repetitivas conservadas (BROCKDORFF *et al.*, 1992; BROWN *et al.*, 1992). O gene *XIST* é fundamental para a inativação *cis* em humanos (MIGEON *et al.*, 1994; DIAZ-PEREZ *et al.*, 2005). A presença de XIC também já foi descrita, no entanto *Xce* até o momento não foi identificado em humanos. É importante ressaltar que, embora os genes *XIST* (em humanos) e *Xist* (em camundongos) apresentem estrutura e posição conservadas no

cromossomo X, é provável que eles não compartilhem todas as funções em comum. (MIGEON, 2007).

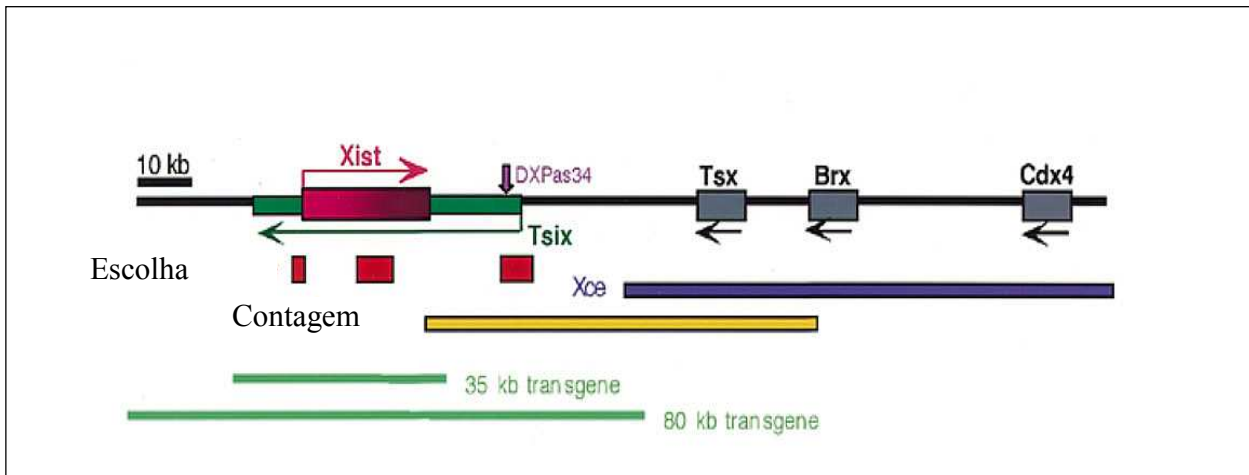


Figura 4. Estrutura do Xic. As etapas do mecanismo da inativação do cromossomo X em camundongos e os respectivos genes que estão envolvidos. [Adaptada de Boumile Lee (2001)].

2.5.5 ETAPAS DA INATIVAÇÃO DO CROMOSSOMO X

Os passos para a inativação do cromossomo X são: contagem, escolha, iniciação, estabelecimento e manutenção. Todos esses passos são controlados geneticamente e de modo distintos (RASTAN; ROBERTSON, 1985; LEE, 1996; HEARD *et al.*, 1999). É importante ressaltar que o mecanismo de inativação somente inicia com a presença de dois “Xics” (RASTAN; ROBERTSON, 1985).

2.5.5.1 CONTAGEM

Esse é o processo caracterizado pela contagem do número de cromossomos sexuais considerando o número de autossomos. A contagem parece ser controlada por uma seqüência a 3' do gene *Xist* (CLERC; AVNER, 1998; BOUMIL; LEE, 2001) que teria a função de “fator bloqueador” e um candidato seria o *DXPas34* (DEBRAND *et al.*, 1999). De forma interessante *Xist* não parece participar dessa etapa (PENNY *et al.*, 1996).

É no *Xic* que será determinado quais e quantos cromossomos X serão inativados (WUTZ; GRIBNAU, 2007) sendo ele essencial para a inativação participando tanto da contagem como da próxima etapa: a da escolha (AVNER; HEARD, 2001).

No entanto, os verdadeiros mecanismos moleculares que norteiam a contagem ainda permanecem desconhecidos (WUTZ; GRIBNAU, 2007).

2.5.5.2 ESCOLHA

A escolha compreende a etapa pela qual um único cromossomo X deve ser escolhido para se manter ativo, em um conjunto celular diplóide. A escolha de qual cromossomo será inativado parece ser um evento mais complexo por necessitar de vários fatores para a sua regulação como, por exemplo, a presença de seqüências dentro de *Xist*, *Tsix* e *Xce* (COURTIER *et al.*, 1995; HENDRICH *et al.*, 1997; PLENGE *et al.*, 1997; LEE; LU, 1999; MARAHRENS *et al.*, 1998; HEARD; AVNER, 2001; LEE, 2005). O próprio *Xist* participa da decisão da seleção dos cromossomos X (CLERC; AVNER, 1998). Em humanos já foi demonstrado que a deleção do principal promotor XIST pode levar ao

desvio da inativação do cromossomo X demonstrando o seu papel crucial na escolha de qual cromossomo será inativado (PLENGE *et al.*, 1997).

No entanto, para a escolha de qual cromossomo X será ativo as últimas evidências apontam que deve existir um gene que não está localizado no cromossomo X, isso porque a deleção de *Xist* não parece afetar a escolha de qual cromossomo X será ativo (CLERC; AVNER, 1998; MIGEON, 2007).

2.5.5.3 INICIAÇÃO

Essa etapa é caracterizada pela dispersão da inativação ao longo do cromossomo X que foi escolhido para ser inativado. O processo de dispersão ocorre a partir do locus de *Xist* presente no Xic e que pode ser visto pelo acúmulo de RNA *Xist* ao longo do cromossomo X escolhido para ser o inativado. Esse processo coincide com a regulação positiva dos altos níveis do *Xist* no cromossomo X escolhido para ser o inativo e concomitantemente com a repressão do *Xist* no cromossomo X escolhido para ser ativo (KAY *et al.*, 1993; BEARD *et al.*, 1995; PANNING *et al.*, 1997; SHEARDOWN *et al.*, 1997).

O gene *Tsix* possui um padrão de expressão que é regulado juntamente com *Xist* durante uma determinada etapa do desenvolvimento (BOUMIL; LEE, 2001) e que em camundongos ocorre durante as primeiras 48 horas da diferenciação celular (WUTZ; JAENISCH, 2000). *Tsix*, por sua vez, é também um RNA de função regulatória agindo predominantemente no núcleo sendo transcrito de modo antisense ao *Xist*. A transcrição de

Tsix no futuro cromossomo X ativo parece ser necessária para prevenir o aumento da expressão de *Xist* e por outro lado a repressão de *Tsix* ocorre no mesmo tempo em que *Xist* RNA se acumula em *cis* (COURTIER *et al.*, 1995; LEE *et al.*, 1999). No entanto, para *Tsix* funcionar adequadamente outros elementos parecem ser necessários como o *DXPas34* e o CTCF (VIGNEAU *et al.*, 2006; COHEN *et al.*, 2007).

2.5.5.4 ESTABELECIMENTO

O estabelecimento da inativação do cromossomo X é até o presente momento a etapa menos esclarecida. A função de silenciamento do gene *Xist* tem sido relatada como restrita no desenvolvimento precoce e em células somáticas específicas como as células precursoras do tecido sanguíneo (SAVARESE *et al.*, 2006) sugerindo que o silenciamento gênico possa ser regulado de modo célula tecido-específica (WUTZ; GRIBNAU, 2007).

2.5.5.5 MANUTENÇÃO

Essa etapa se caracteriza pelo estabelecimento da manutenção do estado inativo através das futuras divisões celulares. O que pode ser observado é que existem modificações sucessivas na estrutura da cromatina do cromossomo X inativo que por serem epigenéticas, não alterarem o código do DNA, mas serão transmitidas para as células somáticas (HEARD, 2005; NAVARRO *et al.*, 2005).

Essa etapa parece ser independente de *Xist* e *Tsix* (BROWN; WILLARD, 1996; CSANKOVSKI *et al.*, 1999; BOUMIL; LEE, 2001). Embora o *Xist* não seja essencial para a manutenção do estado inativo, a sua síntese contínua parece garantir a estabilidade do mecanismo da inativação no cromossomo X inativo (CSANKOVSKI *et al.*, 1999; BOUMIL; LEE, 2001; BROWN; WILLARD, 1996; SADO, 2001). Em camundongos o verdadeiro papel do *Xist* na manutenção não está tão claro (GOTO; MONK, 1998; BOUMIL; LEE, 2001) assim como em humanos, nos quais, a presença de XIST não parece ser essencial para a manutenção da inativação do cromossomo X (RACK *et al.*, 1994; BROWN; WILLARD, 1996).

O principal mecanismo para garantir a transmissão da inativação através da mitose é pela metilação das ilhas CpG no cromossomo X inativado (BOLDUC *et al.*, 2008). Existe um efeito sinérgico da expressão de *Xist*, da metilação do DNA e da desacetilação das histonas (CSANKOVSKI *et al.*, 1999; BOUMIL; LEE, 2001; CSANKOVSKI *et al.*, 2001).

2.5.6 GENES QUE ESCAPAM DA INATIVAÇÃO DO CROMOSSOMO X

Existem regiões localizadas nos cromossomos X e Y que realizam troca de material genético sendo chamadas de regiões pseudoautossômicas. As duas regiões pseudoautossômicas são a PAR1 presente no braço curto dos cromossomos X e Y e a PAR2 localizada no braço longo de ambos os cromossomos X e Y. Os genes da região de PAR1 estão expressos em ambos os cromossomos X nas mulheres e nos cromossomos X e Y nos homens. Já, a região PAR2 diferentemente de PAR1 não participa na meiose e nem

todos os seus genes estão expressos em ambos os cromossomos sexuais (DISTECHE, 1995; MIGEON, 2007).

Segundo Talebizadeh *et al.*, (2006) ao redor de 25% dos genes ligados ao cromossomo X devem escapar da inativação estando a maioria localizados no braço curto do cromossomo X. Carrel e Willard (2005) apóiam a idéia de que 15% dos genes ligados ao cromossomo X escapam da inativação em algum grau. Os 10% adicionais são oriundos dos genes ligados ao cromossomo X e que possuem um padrão de inativação variável no cromossomo X inativo. Talebizadeh *et al.*, (2006) acreditam que esses genes que escapam ou que são expressos do cromossomo X inativo são potencialmente contribuidores para as distorções sexuais, para as diferenças fenotípicas entre as mulheres heterozigotas nas condições ligadas ao cromossomo X, e para as anormalidades clínicas nos pacientes portadoras de alterações cromossômicas do X. Adicionalmente as diferenças na expressão desses genes poderiam ser responsáveis pelo fenótipo relacionado ao sexo nas doenças complexas (CARREL; WILLARD, 2005).

No entanto, um fator limitante na interpretação dos resultados do mecanismo da inativação do cromossomo X talvez seja que essas observações *in vitro* (CARREL; WILLARD, 2005; TALEBIZADEH *et al.*, 2006) como nos híbridos em culturas de fibroblastos, não sejam iguais aos *in vivo* já que outros fatores devem ter interferência nesse processo como, por exemplo, influência hormonal, idade do indivíduo, especificidade e composição do tecido e a produção e ou degradação do RNAm nas células (TALEBIZADEH *et al.*, 2006).

MIGEON, 2007 acredita que os genes que não são totalmente inativos estão em maior número dos que estão completamente silenciosos. A maioria dos genes que escapa da inativação do cromossomo não são totalmente expressos no cromossomo X inativo demonstrando que o escape é parcial ou incompleto. A expressão pode apresentar atividade ao redor de 15%, como por exemplo, o gene da esteróide sulfatase está expresso no cromossomo X inativo com cerca de 30% da expressão do cromossomo X ativo (MIGEON, 1982; HEARD; DISTECHE; 2006). É interessante observar que os genes que escapam da inativação não estão distribuídos de forma aleatória no cromossomo X (CARREL; WILLARD, 2005).

2.5.7 O DESVIO DA INATIVAÇÃO DO CROMOSSOMO X

O desvio da inativação do cromossomo X pode ser primário ou secundário (PUCK; WILLARD, 1998). O desvio primário ocorre no momento da inativação e pode ser decorrente de eventos estocásticos, fatores genéticos como mutações em *XIST* ou em outros genes responsáveis pelo mecanismo de inativação (BELMONT, 1996; LEE; JAENISCH, 1997; BROWN; ROBINSON 2000). Por outro lado, a inativação não randômica secundária ocorre após o mecanismo da inativação e pode ser decorrente de uma seleção celular contra as células que possuem uma mutação deletéria no cromossomo X ativo (LANASA *et al.*, 1999b).

O valor do desvio da inativação do cromossomo X considerado como anormal na maioria dos estudos se situa entre >80:20 ou <80:20 (KUBOTA *et al.*, 1999). No entanto, não existe até o momento um consenso sobre qual a percentagem da inativação do

cromossomo X que é considerada como idealmente não randômica. É encontrada na literatura a ampla variação de 70-95% (PEGORARO *et al.*, 1997; LANASA *et al.*, 1999a; LANASA *et al.*, 2001; ROBINSON *et al.*, 2001; UEHARA *et al.*, 2001; HOGGE *et al.*, 2007). Em outros estudos a classificação utilizada é a do desvio extremo da inativação quando se situa $> 90:10$ (HARRIS *et al.*, 1992; SANGHA *et al.*, 1999; MAIER *et al.*, 2002; BUTLER *et al.*, 2007; TALEBIZADEH *et al.*, 2005).

Está descrito na literatura que 1 a 23%, das mulheres normais podem apresentar desvio da inativação do cromossomo X. O encontro de valores tão diversos pode ser decorrente do emprego de metodologia diferentes pelos autores (RIGGS;GARTLER, 1983; ALLEN *et al.*, 1992; HARRIS *et al.*, 1992; PUCK *et al.*, 1992; ALTERMAN *et al.*, 1993; NAUMOVA *et al.*, 1996; GALE *et al.*, 1997; PEGORARO *et al.*, 1997; PLENGE *et al.*, 1997; KUBOTA *et al.*, 1999; LANASA *et al.*, 1999a; PLENGE *et al.*, 1999; SANGHA *et al.*, 1999; LANASA;HOGGE, 2000; SHARP *et al.*, 2000; UEHARA *et al.*, 2001; PLENGE *et al.*, 2002; BEEVER *et al.*, 2003; SULLIVAN *et al.*, 2003; HATAKEYAMA *et al.*, 2004; KIM *et al.*, 2004; SANDOVICI *et al.*, 2004; AMOS-LANDGRAF *et al.*, 2006; BAGISLAR *et al.*, 2006; HOGGE *et al.*, 2007; PASQUIER *et al.*, 2007).

Nas mulheres não afetadas para as doenças ligadas ao cromossomo X um desvio da inativação do cromossomo X pode não ter nenhuma importância clínica, mas uma taxa alta de desvio pode ser um indicativo do estado de heterozigota para as doenças ligadas ao cromossomo X ou para alterações cromossômicas (BROWN; ROBINSON 2000; WILLARD, 2001).

O desvio da inativação do cromossomo X tem sido associado a várias situações como:

- 1) Em algumas mulheres portadoras de translocações balanceadas entre o cromossomo X/autossomo (ZABEL *et al.*, 1978);
- 2) Mulheres com abortamento espontâneo idiopático recorrente (SANGHA *et al.*, 1999);
- 3) Heterozigotas afetadas com retardo mental ligado ao cromossomo X (PLENGE *et al.*, 2002);
- 4) Algumas pacientes do sexo feminino com autismo apresentam importantes taxas de desvio da inativação do cromossomo X (TALEBIZADEH *et al.*, 2005);
- 5) A gravidade das mulheres portadoras da pré-mutação para a síndrome do X frágil tem sido correlacionada com o padrão do desvio da inativação do cromossomo X com expressão a favor do alelo pré mutado no gene *FMRI* (*Fragile X Mental Retardation Protein*; OMIM 309550) (BERRY-KRAVIS *et al.*, 2005);
- 6) Em pacientes com a síndrome de Rett, a gravidade pode estar correlacionada com o grau do desvio da inativação do cromossomo X (ARCHER *et al.*, 2007; BITTEL *et al.*, 2008);
- 7) Pacientes do sexo feminino com a síndrome de Prader-Willi causada por dissomia uniparental materna do cromossomo 15 podem apresentar desvio da inativação do cromossomo X maior do que as pacientes que apresentam a mesma síndrome por deleção paterna em 15q11-q13 (BUTLER *et al.*, 2007);

- 8) Em tumores através das mutações somáticas (BOLDUC *et al.*, 2008);
- 9) Mulheres que apresentem redução da reserva ovariana com conseqüente menopausa prematura (KLINE *et al.*, 2000; MINKS *et al.*, 2008).

2.5.8 ETIOLOGIA DO DESVIO DA INATIVAÇÃO DO CROMOSSOMO X

Já foi relatado na literatura famílias que apresentavam padrão herdável do desvio da inativação do cromossomo X. Nesses casos a etiologia encontrada foi uma mutação na região promotora do gene *XIST* que conferiu uma inativação preferencial do X em *cis* (PENNY *et al.*, 1996; PANNING *et al.*, 1997; LANASA *et al.*, 1999a.). Pegoraro *et al.*, (1997) descreveu 16 mulheres que possuíam história familiar positiva para distrofia muscular de Duchene e 32% delas apresentavam desvio extremo da inativação do cromossomo X. Os autores sugerem que portadoras de doenças ligadas ao cromossomo X para traços recessivos letais possam apresentar um “fenótipo molecular” herdável do desvio da inativação do cromossomo X (ORSTAVIK *et al.*, 1996; NAUMOVA *et al.*, 1998; *c et al.*, 2003; HERDERA; GORSKI, 2003). No entanto, essa afirmação é contestada por outros autores que não acreditam que o desvio da inativação do cromossomo X seja causado pela desregulação de um único gene somente, mas que talvez seja herdado de forma complexa (BAGISLAR *et al.*, 2006; BOLDUC *et al.*, 2008; MINKS *et al.*, 2008).

A etiologia mais freqüente do desvio da inativação do cromossomo X são as mutações que afetam a proliferação celular (MIGEON, 1998; BIOCCHI *et al.*, 2005). As mulheres que são heterozigotas para vários *loci* localizados no cromossomo X podem

apresentar competição entre as linhagens celulares. Como por exemplo, nas heterozigotas para Adrenoleucodistrofia, de herança ligada ao cromossomo X, que apresentam freqüentemente desvio do padrão de inativação do cromossomo X devido à seleção celular (MIGEON, 2007).

A redução das células embrionárias precursoras e a seleção posteriormente contra essas células podem ser decorrente de uma desvantagem de crescimento pela presença de um rearranjo cromossômico envolvendo o cromossomo X ou nas heterozigotas para doenças ligadas ao cromossomo X (BELMONT 1996; PLENGE, 1997; PUCK; WILLARD, 1998; BROWN; ROBINSON, 2000; BUTLER *et al.*, 2007). Entretanto, também é possível que essa limitação celular ocorra ao acaso e no momento da inativação do cromossomo X apenas uma pequena população de células dê origem a um determinado tecido (MINKS *et al.*, 2008). Caso essa pequena proporção de células embrionárias esteja presente no cromossomo X que foi selecionado como não inativado poderá ocorrer desvio do padrão da inativação considerado como normal através das sucessivas divisões celulares (SANDOVICI *et al.*, 2004).

De outra forma o desvio da inativação do cromossomo X também pode ser adquirido devido à depleção do conjunto das células tronco hematopoéticas em adição aos fatores estocásticos ou seletivos (ROSSEAU *et al.*, 1991; FILOSA *et al.*, 1996; KELLER *et al.*, 1999; SANDOVICI *et al.*, 2004).

Em resumo, as principais etiologias do desvio extremo da inativação do cromossomo X:

- 1) Uma mutação no gene *XIST* (PLENGE *et al.*, 1997);

- 2) Seleção celular contra as células por uma desvantagem de crescimento das células mutantes ou deletadas em um dos cromossomos X (PEGORARO *et al.*, 1997);
- 3) Redução das células precursoras embrionárias (SANGHA *et al.*, 1999);
- 4) Presença de uma translocação X/autossomo (SANGHA *et al.*, 1999);
- 4) Ao acaso (SULLIVAN *et al.*, 2003);
- 5) Outras: gemelaridade, mosaicismo confinado a placenta, insultos ambientais entre outros (BAGISLAR *et al.*, 2006).

2.5.9 AS TAXAS DE DESVIO DA INATIVAÇÃO DO CROMOSSOMO X E IDADE

Vários estudos relatam que a frequência do desvio do padrão da inativação do cromossomo X aumenta com a idade (ALLEN *et al.*, 1992; BUSQUE *et al.*, 1996; GALE *et al.*, 1997; EL KASSAR *et al.*, 1998; SHARP *et al.*, 2000; HATAKEYAMA *et al.*, 2004; SANDOVICI *et al.*, 2004) e os valores podem se situar entre 3-4% em mulheres com idades entre 18 a 50 anos. A partir dos 75 anos 33%-75% das células derivadas das linhagens mielóides (FEY *et al.*, 1994; BUSQUE *et al.*, 1996; CHAMPION *et al.*, 1997; GALE *et al.*, 1997) e 9% das células da linhagens linfóides podem apresentar um desvio extremo da inativação (GALE *et al.*, 1997; LANASA *et al.*, 2001). Segundo Busque *et al.*, (1996) 2% dos recém-nascidos e 4.5% das mulheres com idade de 28 a 32 anos podem apresentar desvio extremo da inativação do cromossomo X. Para outros autores as taxas de desvio extremo da inativação do cromossomo X em mulheres abaixo de 25 anos ficam

entre 1-7% e em maiores de 60 anos 2-16% (ALLEN *et al.*, 1992; BULLER *et al.*, 1999; BAGISLAR *et al.*, 2006).

De forma interessante, foi observado que recém nascidos apresentaram desvio maior nas células hematopoéticas do que das células epiteliais, mas em mulheres jovens essa diferença não foi identificada entre esses tecidos. Por outro lado, em mulheres acima dos 60 anos as células sanguíneas apresentam taxas maiores de desvio (SANDOVICI *et al.*, 2004; KRISTIANSEN *et al.*, 2005; BOLDUC *et al.*, 2008). Bittel *et al.*, (2008) demonstraram não existir diferenças significativas no padrão de inativação do cromossomo X entre 34 tipos de tecidos estudados, em uma amostra de 26 mulheres. No entanto, uma tendência foi obtida com o avançar da idade para o aumento da variabilidade no padrão de inativação do cromossomo X principalmente em mulheres acima de 60 anos. Outros autores (HOGGE *et al.*, 2007) sugerem que a associação com o aumento do desvio da inativação também se correlaciona positivamente com idade, mas já pode ser encontrada a partir dos 30 anos.

Várias etiologias têm sido sugeridas para o aumento das taxas de desvio da inativação do cromossomo X com o avançar da idade: 1) eventos ao acaso como replicação das células tronco hematopoéticas, apoptose e o início da diferenciação e maturação celular (BUSQUE *et al.*, 1996; BITTEL *et al.*, 2008); 2) depleção das células tronco hematopoéticas e diferenciação randômica das células residuais (BUSQUE *et al.*, 1996; BITTEL *et al.*, 2008); 3) seleção das células tronco hematopoéticas que exibiriam uma inativação preferencial de um dos cromossomos X (ABKOWITZ *et al.*, 1996; BUSQUE *et al.*, 1996; GALE *et al.*, 1997).

Nos estudos de determinação do padrão de metilação do DNA em gêmeos monozigóticos foi observado que, embora eles sejam idênticos epigeneticamente em idades mais jovens, com o avançar da idade as diferenças no conteúdo e distribuição das metilcitosinas e acetilação das histonas associadas à expressão gênica se tornam divergentes (FEARON *et al.*, 1988; PUCK, 1998; FRAGA *et al.*, 2005; KRISTIENSEN *et al.*, 2005).

Não se sabe se existe diferença nas taxas dos desvios da inativação do cromossomo X entre os grupos raciais (SULLIVAN *et al.*, 2003).

2.5.10 HETEROZIGOTAS PARA DOENÇAS LIGADAS AO CROMOSSOMO X E ABORTAMENTO DE REPETIÇÃO

O abortamento espontâneo é definido com a perda da gravidez antes da 20ª semana de idade gestacional (HEFFNER, 2004; WARREN; SILVER, 2008). Aos 20 anos a taxa é de 10%, ao redor de 15% entre 30-34 anos, enquanto que, após 45 anos alcança os níveis de 75% a 90% (HEFFNER, 2004).

As perdas gestacionais podem ser esporádicas e recorrentes. O abortamento recorrente tradicionalmente é definido a partir da perda de 3 ou mais gravidezes consecutivas anteriormente à viabilidade fetal ou com peso fetal $\leq 500\text{g}$ (CARRINGTON *et al.*, 2005; HOGGE *et al.*, 2007). Alguns estudos utilizam esse termo a partir de duas perdas gestacionais ou a partir de três não consecutivas (PEGORARO *et al.*, 1997; SANGHA *et al.*, 1999; LANASA *et al.*, 1999a; LANASA *et al.*, 2001; ROBINSON *et al.*, 2001; UEHARA *et al.*, 2001; SULLIVAN *et al.*, 2003; KIM *et al.*, 2004). A incidência do

abortamento de repetição é variável na literatura, mas estudos apontam para valores entre 1-5% (STEPHENSON, 2002; CARRINGTON *et al.*, 2005; PASQUIER *et al.*, 2007; HOGGE *et al.*, 2007; KUO *et al.*, 2008).

Existem múltiplas etiologias para o abortamento espontâneo: defeitos congênitos, alterações genéticas, endocrinológicas, agentes teratogênicos, fatores imunológicos, anormalidades uterinas estruturais e infecções (LANASA *et al.*, 1999b; HEFFNER, 2004; CARRINGTON *et al.*, 2005; KAARE *et al.*, 2008). A principal causa são as aneuploidias cromossômicas podendo ocorrer em cerca de 25-50% das gestações (STEPHENSON *et al.*, 2002; GREENWOLD; JAUNIAX, 2002). A idade materna no momento da concepção é um forte fator de risco independente para o abortamento devido ao aumento na taxa de ocorrência para cromossomopatias (NYBO *et al.*, 2000). Entretanto, em 37-79% dos casos não se chega a um diagnóstico etiológico específico (CLIFFORD *et al.*, 1997; PEGORARO *et al.*, 1997; CARRINGTON *et al.*, 2005; RAI; REAGAN *et al.*, 2006; KAARE *et al.*, 2008).

Na literatura, estudos apontam para o aumento de incidência de abortamento em heterozigotas para doenças genéticas ligadas ao cromossomo X. Alguns autores afirmam que o desvio da inativação do X pode ser um fator etiológico no abortamento de repetição (PEGORARO *et al.*, 1997; LANASA *et al.*, 1999a; SANGHA *et al.*, 1999; LANASA; HOGGE, 2000; HOGGE *et al.*, 2001; LANASA *et al.*, 2001; UEHARA *et al.*, 2001; BEEVER *et al.*, 2003; KIM *et al.*, 2004; BAGISLAR *et al.*, 2006). A taxa de abortamento na população de uma forma geral é ao redor 15%, mas para heterozigotas de doenças ligadas ao cromossomo X poderia chegar a 40% (soma dos 15% da população com 25% da recorrência para o risco das doenças recessivas ligadas ao cromossomo X)

(LANASA *et al.*, 1999a). No entanto, esses autores referem que o excesso de heterozigotas encontrados pode ter sido decorrente de fatores confundidores como a idade e a associação com o desvio da inativação do cromossomo X. A opinião de que heterozigotas para doenças ligadas ao cromossomo X apresentariam um aumento na taxa de abortamento não é uniforme (SULLIVAN *et al.*, 2003; KIM *et al.*, 2004; HOGGE *et al.*, 2007; PASQUIER *et al.*, 2007).

Por outro lado as discrepâncias entre os estudos podem ser devidas a uma ausência de uma metodologia uniforme: número pequeno de pacientes e controles, diferentes critérios de inclusão e a idade das pacientes (PASQUIER *et al.*, 2007; KAARE *et al.*, 2008).

2.5.11 HETEROZIGOTAS PARA GENES LIGADOS AO X E A INATIVAÇÃO DO CROMOSSOMO X

A inativação do cromossomo X permite que as heterozigotas para genes ligados ao X sejam consideradas como mosaicos para a expressão de tais genes. Elas apresentam uma mistura de duas populações celulares e cada uma contém um cromossomo X ativo de origem parental diferente (MIGEON, 2006). O mosaicismo que caracteriza tais heterozigotas é único porque a variabilidade não é somente entre as mulheres, mas, também, entre tecidos e células (MIGEON 2007). Esse mosaicismo é importante para a diversidade fisiológica dos genes ligados ao cromossomo X, mas, por outro lado, contribui para uma vulnerabilidade biológica nos homens em relação às doenças ligadas ao cromossomo X (MIGEON, 2006).

Ao analisarmos as conseqüências da inativação do cromossomo X podemos observar as seguintes diferenças entre os sexos: 1) o cromossomo Y possui um menor número de genes do que o X; por outro lado, possui genes que não são encontrados nesse último cromossomo; 2) no mínimo 15% dos genes que escapam da inativação são expressos em quantidade maior e variável nas mulheres; 3) 10% dos genes têm uma inativação do cromossomo X heterogênea levando à expressão diferencial entre as mulheres e os homens; 4) a natureza randômica da inativação do cromossomo X determina que as mulheres sejam mosaicos (LYON 1961; CARREL; WILLARD, 2005).

2.6 MULHERES SINTOMÁTICAS NAS DOENÇAS LIGADAS AO CROMOSSOMO X

As mulheres podem ser sintomáticas para doenças ligadas ao cromossomo X se apresentarem alguma das situações abaixo relacionadas (MIGEON *et al.*, 1993):

- 1) Apresentarem alguma alteração citogenética que desfavoreça o estado de heterozigose. Como por exemplo, a presença de um único cromossomo X ou de uma translocação não balanceada entre o X/autossomo;
- 2) Possuir em ambos os cromossomos X uma mutação causadora da doença;
- 3) Apresentarem desvio da inativação do cromossomo X a favor das células mutadas;
- 4) Possuir células normais incapazes de suprir a necessidade metabólica das células mutadas;

Em algumas das doenças ligadas ao cromossomo X as mulheres afetadas podem apresentar igual ou menor número de sinais e sintomas que os homens quando hemizigotos para a mesma mutação (MIGEON, 2007).

Gêmeas monozigóticas podem ser discordantes para algumas doenças ligadas ao cromossomo X e de maneira não muito explicada apresentar desvio da inativação do cromossomo X (NANCE, 1990; VALLEIX *et al.*, 2002).

Em poucas situações a inativação do cromossomo X pode não ser randômica e modular o fenótipo nas mulheres heterozigotas para genes ligados ao cromossomo X. O desvio da inativação pode ser decorrente da seleção celular agindo a jusante do processo de inativação. A composição de cada cromossomo X pode levar a uma vantagem seletiva o que pode vir a resultar na sobrevivência clonal e proliferativa. Normalmente a seleção nas doenças ligadas ao cromossomo X é negativa para o gene afetado, o que leva à redução ou à abolição dos sinais e sintomas das mulheres heterozigotas para as mutações ligadas ao cromossomo X. Por outro lado, raramente a inativação do cromossomo X pode ocorrer contra o alelo selvagem resultando em doença clinicamente significativa ou no aumento da gravidade dos sinais clínicos (MARTINEZ *et al.*, 2005; MORLEO; FRANCO, 2008).

A seleção negativa pós-inativação favorecendo o alelo têm sido documentada em doenças ligadas ao cromossomo X, como por exemplo, na Adrenoleucodistrofia ligada ao cromossomo X (MIGEON *et al.*, 1979; MIGEON *et al.*, 1981; MIGEON, 2007). Por outro lado, na deficiência de G6PD e na síndrome de Lesch-Nyhan a seleção é a favor do alelo normal (MIGEON *et al.*, 1979; MIGEON, 2007) e, dessa maneira, o efeito das células mutantes é eliminado na maioria das vezes.

2.6.1 HETEROZIGOTAS E SINAIS E SINTOMAS DE MPS II

Na literatura está descrito que as heterozigotas de MPS II são assintomáticas (CLARKE *et al.*, 1993). Schwartz (2004), em sua tese de doutorado avaliou 52 mulheres, com 16 anos ou mais e história familiar positiva para MPS II. A amostra foi estudada do ponto de vista bioquímico através da coleta de GAGs urinários e dosagens enzimáticas de IDS em plasma e leucócitos, bem como anamnese e exame físico (realizado por vários examinadores). Nas 40 heterozigotas a excreção de GAGs urinários foi normal, a atividade da IDS estava reduzida em leucócitos e plasma e todas eram assintomáticas.

No entanto, faltam trabalhos na literatura que estudem a relação da possível presença de sinais clínicos sutis sugestivos da doença nessas mulheres com a identificação de marcadores biológicos que permitam uma suspeita inicial das heterozigotas com o objetivo de triagem para aconselhamento genético nas famílias com história de MPS II.

Para algumas doenças, como a doença de Fabry, que possuem o mesmo mecanismo de herança da MPS II, as heterozigotas apresentam sintomas e sinais da doença em uma proporção maior que o esperado para uma doença recessiva ligada ao cromossomo X (DESNICK, 2001; MAIER *et al.*, 2006; WANG *et al.*, 2007).

2.6.2 PACIENTES DO SEXO FEMININO COM MPS II

A ocorrência de MPS II em mulheres é muito rara, e desde 1977 foram relatados cerca de 10 casos na literatura (Quadro 4).

Quadro 4. Dados disponíveis na literatura sobre a caracterização clínica e molecular das mulheres sintomáticas com Mucopolissacaridose tipo II *

Referência	Mutação	Cariótipo	Inativação do cromossomo X	Quadro Clínico
NEUFELD <i>et al.</i> , 1977 ¹	Não Identificada	46,XX	Não Testado	ADNPM [±] , face típica, surdez, hepatoesplenomegalia
NEUFELD <i>et al.</i> , 1977	Não Identificada	46,XX	Não Testado	ADNPM, face típica, surdez, hepatoesplenomegalia, hipertrofia de adenóides
MOSSMANN <i>et al.</i> , 1983	t(X;5)	46,XX t(X;5)**	Não Randômica	ADNPM, face típica, disostose múltipla, contraturas articulares, surdez, hepatoesplenomegalia, hipertrofia de adenóides
BROADHEAD <i>et al.</i> , 1986	del Xq25	delXq25	Não Randômica	ADNPM, face típica, disostose múltipla, contraturas articulares, surdez, hepatoesplenomegalia, hipertrofia de adenóides
CLARKE <i>et al.</i> , 1991	3-5cM-modelo	delXq27-28	Não Randômica	ADNPM, face típica, disostose múltipla, contraturas articulares, hepatoesplenomegalia
WINCHESTER <i>et al.</i> , 1992	Não Identificada	46,XX	Não Randômica	ADNPM, face típica, contraturas articulares, surdez
SUKEGAWA <i>et al.</i> , 1997	p.R468Q	46,XX	Não Randômica	ADNPM, face típica, disostose múltipla, contraturas articulares, surdez, hepatoesplenomegalia
SUKEGAWA <i>et al.</i> , 1998	p.R468L	46,XX	Não Randômica	ADNPM, face típica, disostose múltipla
CUDRY <i>et al.</i> , 2000	p.L41P/ L41P	46,XX	Não Randômica	Disostose múltipla e hepatoesplenomegalia
CUDRY <i>et al.</i> , 2000	g.17419 del13254+g.17418 ins20	46,XX	Não Randômica	ADNPM, face típica, disostose múltipla, contraturas articulares, surdez, hepatoesplenomegalia
TUSCHL <i>et al.</i> , 2004	c.706_719 del + c.706insG	46,XX	Não Randômica	ADNPM, face típica, disostose múltipla, contraturas articulares, surdez, hepatoesplenomegalia, hipertrofia de adenóides

*Adaptado de Tuschl *et al.*, (2004); [±]ADNPM= atraso do desenvolvimento neuropsicomotor; ¹uma das pacientes posteriormente foi sugerida como tendo o diagnóstico de deficiência múltipla de sulfatases

Discute se a possibilidade de que um dos casos de Neufeld *et al.*, (1977) talvez apresentasse deficiência múltipla de sulfatases (CLARKE *et al.*, 1991). Os sintomas apresentados em mais de 50% das pacientes foram: retardo mental, face grosseira, disostose múltipla, contraturas articulares, surdez e hepatoesplenomegalia, sendo que a maioria das afetadas apresentava o fenótipo grave. (NEUFELD *et al.*, 1977; MOSSMANN *et al.*, 1983; BROADHEAD *et al.*, 1986; CLARKE *et al.*, 1991; WINCHESTER *et al.*, 1992; SUKEGAWA *et al.*, 1997; SUKEGAWA *et al.*, 1998; CUDRY *et al.*, 2000; TUSCHL *et al.*, 2004). Vários mecanismos são sugeridos para o acometimento de MPS II em heterozigotas. Uma das possíveis explicações seria a presença de alterações estruturais no cromossomo X de modo a permitir que um rearranjo cromossômico interfira no processo da inativação; um segundo mecanismo seria a inativação preferencial do cromossomo X normal e, por fim, outra explicação seria a ocorrência de 2 mutações, uma em cada alelo do gene da *IDS*, conferindo o estado de homozigose. Dentre os mecanismos citados anteriormente, o mais freqüentemente observado é a inativação preferencial do cromossomo X que contem o alelo selvagem (TUSCHL *et al.*, 2004).

Segundo TUSCHL *et al.*, 2004, a maioria das pacientes teria herdado o gene mutado da mãe e a inativação ocorreu no cromossomo X paterno. No entanto, a causa dessa inativação preferencial do alelo não mutante ainda não está elucidada em todos os casos.

2.7 DETECÇÃO DO PADRÃO DE INATIVAÇÃO DO CROMOSSOMO X

O uso de polimorfismos como marcadores genéticos para estudo do padrão de inativação do cromossomo X é baseado nas seguintes observações: 1) um único cromossomo X é ativo por célula somática em adultos; 2) a inativação randômica do cromossomo X ocorre em cada célula, em um estágio precoce da embriogênese, sendo que o padrão da inativação do cromossomo X é transmitido de cada célula progenitora de maneira estável para a prole.

A taxa das células que contém o cromossomo X ativo de origem paterna ou materna varia entre as mulheres porque a inativação ocorre ao acaso, mas é esperado que cada cromossomo X contribua com 50% da sua expressão (GARTLER; RIGGS 1983; FEARON *et al.*, 1988).

2.7.1 DETECÇÃO DAS TAXAS DE DESVIO DA INATIVAÇÃO DO CROMOSSOMO X

As mulheres que são heterozigotas para genes situados no cromossomo X possuem polimorfismos de nucleotídeos que estão amplamente dispersos de maneira diversa em cada cromossomo X. A medida de heterozigose nos genes ligados ao cromossomo X pode ser identificada por essas seqüências. Adicionalmente, eles também podem ser marcadores para a pesquisa de doenças genéticas nas famílias (ROSS *et al.*, 2005).

A taxa do desvio da inativação do cromossomo X ou do padrão de inativação pode ser obtida através de vários métodos: 1) análise da expressão (BEUTLER *et al.*, 1962); 2) análise da transcrição (PRCHAL *et al.*, 1993); 3) análise do padrão de metilação (VOGELSTEIN *et al.*, 1987) e 4) pesquisa de genes polimórficos ligados ao cromossomo

X (ALLEN *et al.*, 1992). O Quadro 5 apresenta um resumo das várias técnicas descritas na literatura.

As técnicas mais utilizadas atualmente são as descritas por Allen *et al.*, (1992), Frommer *et al.*, (1992), Allen *et al.*, (1994) e Herman *et al.*, (1996). O gene do receptor de andrógeno humano (*HUMARA*) está localizado em Xq11. Ele é altamente polimórfico contendo de 11 a 31 repetições CAG no primeiro éxon, sendo que ao redor de 90% das mulheres possuem alelos diferentes. A investigação do padrão de inativação do cromossomo X somente é possível em mulheres que apresentem dois alelos diferentes (heterozigotas), através da digestão do DNA utilizando uma enzima de restrição metilação sensível, como por exemplo, a *Hpa II*. Essa enzima não irá digerir os alelos metilados e, portanto inativos. Numa segunda etapa, é realizada a amplificação por PCR (reação em cadeia de polimerase). Segue-se a eletroforese, por capilaridade, e os picos resultantes determinam a taxa de desvio. A taxa de intensidade do sinal é diretamente relacionada à quantidade de produto de PCR produzido. Se a inativação for randômica a paciente apresentará o mesmo número de alelos paternos e maternos metilados (ALLEN *et al.*, 1992).

O padrão de inativação do cromossomo X segue a distribuição da Curva de Gauss na população das mulheres normais (MIGEON *et al.*, 1998; BITTEL *et al.*, 2008).

A principal limitação da técnica *HUMARA* reside no fato de que a enzima pode não ser tão sensível e os alelos inativos nem sempre estão suficientemente metilados em todas as células para resistirem à digestão (KUBOTA *et al.*, 1999), o que pode levar a uma

subestimativa do grau verdadeiro de desvio da inativação (SHARP *et al.*, 2000; KIM *et al.*, 2004).

Quadro 5. Métodos de identificação do padrão da inativação do cromossomo X

Tipo de identificação	Aplicação/Problemas/Soluções	Autor
Comparação do padrão de metilação entre os cromossomos X ativo e inativo com enzima de restrição e o método de <i>Southern Blot</i>	Técnica que utiliza duas enzimas de restrição	VOGELSTEIN <i>et al.</i> , 1987
Comparação entre tempo de replicação dos cromossomos X ativo e inativo	Quando existe uma alteração estrutural	KUBOTA <i>et al.</i> , 1999; PERRY;WOLF, 1974
Produção de híbridos de roedores/humanos	Técnica cara e mais demorada	KUBOTA <i>et al.</i> , 1999 PUCK <i>et al.</i> , 1987
Distinção entre o padrão de metilação paterno e materno através de polimorfismos do gene HUMARA*	Necessária o uso da enzima de restrição e nem sempre o DNA está completamente não metilado	ALLEN <i>et al.</i> , 1992 ALLEN <i>et al.</i> , 1994
Metilação específica por PCR**	Não precisa da enzima de restrição	FROMMER <i>et al.</i> , 1992 HERMAN <i>et al.</i> , 1996

*HUMARA gene do receptor de andrógeno

**PCR reação em cadeia da polimerase

O padrão de metilação pode variar entre os indivíduos e também no mesmo indivíduo, que pode apresentar diferenças nos tecidos e células. O fato de que as células sanguíneas são as mais estudadas por serem de fácil acesso, pode ser uma limitação na interpretação dos resultados, já que elas apresentam um alto grau de reposição celular. Essa capacidade de renovação celular pode conferir uma maior predisposição à seleção celular e dessa forma o grau de desvio pode estar sendo subestimado. O ideal seria realizar estudos de expressão gênica ou de RNA (MIGEON, 2007).

A determinação do padrão de inativação do cromossomo X em portadoras de doenças ligadas ao X é de importância para um melhor entendimento da patogênese da doença e para a realização do aconselhamento genético.

3 JUSTIFICATIVA

O Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre é centro de referência para diagnóstico e manejo das Doenças Lisossômicas de Depósito. A Rede MPS Brasil presta serviço aos pacientes com MPS, aos seus familiares e aos profissionais da área da saúde. Ao acompanharmos pacientes com MPS II e seus familiares foi verificada a escassez de estudos sobre heterozigotas com MPS II, e a ausência de informações publicadas sobre a presença de sinais e sintomas sutis nessas mulheres. Um melhor entendimento sobre eventuais manifestações sutis dessa doença em heterozigotas para MPS II, além de preencher uma lacuna na literatura é importante para fornecer orientação adequada às famílias acometidas por MPS II.

4 OBJETIVOS

4.1 GERAL

Avaliar a presença de sinais e sintomas possivelmente relacionados à heterozigose para MPS II, contribuindo para estimar o impacto desta condição nessas mulheres através da identificação de marcadores sensíveis e específicos.

4.2 ESPECÍFICOS

4.2.1 Avaliar a frequência de alterações no cromossomo X nas heterozigotas para MPS II;

4.2.2 Avaliar o padrão de inativação do cromossomo X nas heterozigotas para MPS II;

4.2.3 Avaliar a presença de marcadores bioquímicos sensíveis e específicos, potencialmente relacionados com a heterozigose para MPS II;

4.2.4 Avaliar a ocorrência de possíveis marcadores de imagem nas heterozigotas para a MPS II;

4.2.5 Avaliar a possível ocorrência de uma maior frequência de abortamento espontâneo na prole de heterozigotas para MPS II.

5 METODOLOGIA

5.1 DELINEAMENTO

Esse foi um estudo transversal observacional.

5.2. POPULAÇÃO DO ESTUDO

A amostra selecionada foi de conveniência, proveniente do ambulatório de MPS SGM-HCPA e foi composta por mulheres com história familiar positiva para MPS II. Foi projetada a inclusão de 50 mulheres nesse estudo, número estimado a partir do acompanhamento de 25 pacientes com MPS II no ambulatório.

Foram convidadas a participar as mães e familiares de pacientes masculinos com MPS II avaliados no ambulatório de MPS do SGM-HCPA, ao longo dos anos de 2007 e 2008.

As familiares foram inicialmente classificadas em 2 grupos: o das heterozigotas obrigatórias, se ela 1) tivesse pelo menos dois filhos afetados ou 2) tivesse um filho afetado e história familiar positiva compatível com herança ligada ao cromossomo X; e o das possíveis heterozigotas caso elas não preenchessem os critérios anteriores. A classificação definitiva em heterozigota foi baseada de acordo com o resultado da análise molecular após

a identificação da mutação específica no caso índice, quando possível. A classificação em não heterozigota foi estabelecida de acordo com a ausência da mutação previamente identificada no probando.

5.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

- Apresentar história familiar positiva para MPS II;
- Ser do sexo feminino;
- Possuir mais de 16 anos;
- Assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE (Anexo 2) para participação do estudo e um Termo de Autorização para Uso de Imagens (Anexo 3);

5.4 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Não ser possível a definição do estado de heterozigota porque a análise molecular no probando não possibilitou o achado da mutação patogênica no caso-índice ou porque a história familiar não era compatível com heterozigota possível.

5.5 VARIÁVEIS ESTUDADAS

Após a assinatura do TCLE foi realizada anamnese e o exame físico. Ambos os procedimentos foram realizados sempre pelo mesmo examinador. As informações coletadas foram: idade, grau de parentesco com o caso-índice MPS II, consangüinidade, estado de heterozigota ou não, idade da menarca, número de gestações, número de partos e de abortos. A anamnese foi focada principalmente nos seguintes órgãos e sistemas: cardiovascular, pulmonar, osteoarticular e gastrointestinal. No exame físico foram realizadas as medidas antropométricas habituais bem como a avaliação semiológica habitual (Ficha de anamnese e exame clínico - Anexo 4). Tanto a anamnese quanto o exame físico foram focados nos sinais e sintomas relacionados com MPS II.

5.6 ANÁLISE BIOQUÍMICA

5.6.1 DOSAGEM DA EXCREÇÃO URINÁRIA DE GAGS

Os GAGs foram coletados e analisados a partir de uma amostra ocasional de urina coletada pela manhã. A análise foi realizada no Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo do SGM-HCPA (LREIM) de acordo com as técnicas padrão já estabelecidas (de JONG *et al.*, 1992). Os valores normais de referência estabelecidos para adultos pelo LREIM são de 13-45mg/mmoL creatinina.

5.6.2 MEDIDA DA ATIVIDADE DE IDS

Nas mulheres participantes a medida da atividade enzimática da IDS foi realizada em leucócitos e plasma (VOZNYI *et al.*, 2001). Os valores considerados como de referência para adultos pelo LREIM são de 122-463 nmoles/4h/ mL para IDS em plasma e 31-110 nmoles/4h/mg proteína para a IDS em leucócitos.

5.7 ANÁLISE DO CARIÓTIPO

A análise do cariótipo foi realizada a partir da coleta de sangue periférico das mulheres participantes. Um total de 20 células foram analisadas em amostra das participantes. A metodologia utilizada seguiu protocolos descritos na literatura (MOORHEAD *et al.*, 1960; SEABRIGHT, 1970).

5.8 ANÁLISE DO GENE *IDS*

Todas as mulheres que aceitaram participar deste estudo foram submetidas à sangue periférico para a extração de DNA genômico de leucócitos pelo método de precipitação de sais (MILLER *et al.*, 1988). A identificação da mutação patogênica foi inicialmente realizada no caso índice, de acordo com o protocolo de investigação abaixo descrito (REDE MPS):

- 1) Pesquisa da inversão entre o gene e o pseudogene *IDS*, e que ocasiona disrupção do gene *IDS*, por meio de PCR. Caso essa etapa fosse negativa, a próxima etapa era realizada (número 2);
- 2) Amplificação dos nove éxons do gene da *IDS*. Caso não houvesse amplificação de um ou mais éxons, constatar-se-ia a presença de deleção do éxon(s) envolvido(s). Mas, se os éxons amplificassem normalmente, era necessário ir para a próxima etapa (número 3);
- 3) Seqüenciamento do éxon IX do gene *IDS*. Se, após a realização do seqüenciamento deste éxon ainda não fossem encontradas alterações, a próxima etapa era necessária (número 4);
- 4) Realização de *SSCP* dos demais éxons seguido de sequenciamento do éxon que apresentasse o padrão alterado. Caso nenhum éxon mostrasse padrão alterado no *SSCP*, a última etapa era realizada (número 5);
- 5) Sequenciamento dos éxons I a VIII do gene *IDS*.

A pesquisa da mutação nas heterozigotas foi realizada de acordo com o tipo de mutação encontrada no probando. Por exemplo, se o probando apresentasse uma inversão ou disrupção do gene da *IDS*, a mesma alteração era pesquisada por PCR na familiar. No entanto, se o caso índice apresentasse uma deleção do gene da *IDS*, identificada por PCR, era necessário confirmar a pesquisa por *Southern Blot*. Essa técnica não é realizada no SGM-LREIM e dessa forma, as amostras (probandos e possíveis heterozigotas) foram enviadas para a equipe do Dr. Maurizio Scarpa, *Laboratori Diagnosi e Studio Malattie Rare, Università Degli Studi Di Padova, Padova Itália*.

5.9 ANÁLISE DO PADRÃO DE INATIVAÇÃO DO CROMOSSOMO X

O padrão polimórfico CAG do locus *HUMARA* (Xq11-q12) foi analisado em produtos amplificados a partir de amostras de DNA genômico, através da técnica de PCR com iniciadores do gene do receptor de andrógeno, e posterior genotipagem de microssatélites em seqüenciador. Nesta etapa, tivemos como objetivo identificar as mulheres informativas (heterozigotas) para este polimorfismo, cujos padrões de inativação foram posteriormente determinados. As condições utilizadas foram as descritas por Delabesse *et al.*, (1995). O padrão de inativação dos cromossomos X foi determinado para todas as mulheres heterozigotas para a repetição CAG do locus *HUMARA*, através do padrão de metilação dos sítios de restrição para a enzima *HpaII* situados próximos a esta repetição. A análise do padrão de metilação foi feita em produtos amplificados de amostras de DNA digeridas ou não digeridas com *HpaII*, através da técnica de PCR com um par de iniciadores específicos para o locus *HUMARA*.

A presença de desvio extremo de inativação foi considerada apenas quando a amplificação de um dos alelos após a digestão com *HpaII* foi >80% (KUBOTA *et al.*, 1999).

A técnica HUMARA foi realizada em colaboração com o Instituto Nacional do Câncer (INCA), no Rio de Janeiro com o auxílio dos pesquisadores Dr Juan Clinton Llerena e a Dra Lúcia de Fátima Marques de Moraes.

5.10 EXAMES DE IMAGEM

Os exames de imagem foram realizados no Hospital Mãe de Deus Center, Porto Alegre, por 2 avaliadores que desconheciam o estado de heterozigotas ou não heterozigotas das mulheres avaliadas. As análises realizadas foram feitas de modo independente entre os mesmos. Todos os exames foram realizados sem contraste sem qualquer procedimento sedativo.

5.10.1 TOMOGRAFIA COMPUTADORIZADA ABDOMINAL DE FÍGADO E DE BAÇO

A mensuração do fígado e baço foi realizada qualitativa e quantitativamente, utilizando imagens axiais de tomografia computadorizada helicoidal, com espessura de corte e intervalo de reconstrução com 3 mm.

A mensuração qualitativa para classificação de hepatomegalia foi realizada utilizando uma escala de 4 graus: ausente (limite inferior do fígado acima do rebordo do rim direito), leve (limite inferior do fígado a menos de 2 cm abaixo do rebordo do rim direito), moderado (entre 2-4 cm) e grave (maior que 4 cm).

A mensuração qualitativa para classificação de esplenomegalia foi realizada utilizando uma escala de 4 graus: ausente (baço com diâmetro craniocaudal menor que 12 cm), leve (12-14 cm), moderado (14-16 cm) e grave (acima de 16 cm).

Os volumes quantitativamente foram obtidos a partir de imagens axiais com espessura de 3 mm. Os dados obtidos foram transferidos para estação de trabalho auxiliar

para pós-processamento. O pós-processamento foi feito por um físico treinado utilizando o programa de computador *Image J* do *National Institute of Health (NIH)*. Os volumes foram quantificados em número de *voxels* e cm^3 utilizando a ferramenta *Voxel Counter* do programa *Image J*. Todos os volumes obtidos do fígado e baço foram normalizados usando como referência o volume abdominal total.

5.10.2 TOMOGRAFIA COMPUTADORIZADA DA COLUNA LOMBAR

A análise da morfologia da coluna foi realizada através de cortes tomográficos da coluna lombar obtidas no plano axial e reformatadas no plano sagital para posterior revisão. Para padronização foi escolhido o corpo vertebral de L3 e classificada em 2 tipos: normal ou alterada. As alterações que poderiam ser encontradas e que foram consideradas como sugestivas de MPS II: sinais de platispondilia, redução da altura ou outra deformidade do corpo vertebral.

5.10.3 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA DO CRÂNIO

A mensuração dos volumes cerebrais foi realizada utilizando imagens de ressonância magnética (RM) de alto campo (1.5 T). O protocolo de imagem de RM consistiu na aquisição de 2 imagens transversas obtidas paralelas a linha que se situa entre as partes infero anterior e infero posterior do corpo caloso: 1) FLAIR (*fluid attenuated inversion recovery*) com tempo de repetição (TR) de 9000 mseg e tempo de eco (TE) de

114 msec, tempo de inversão (TI) de 2500 msec, e 2) T2, com TR de 4000 msec e TE de 99 msec. As fatias realizadas tinham 5 mm e o campo de variação foi 180 a 230.

Para a análise das variáveis da RM foram realizadas as seguintes medidas: volume cerebral normalizado, volume normalizado do líquido e carga de lesões normalizadas em *FLAIR*. Para pré-processamento, segmentação e análise quantitativa nós usamos o programa de computador *image J do NIH*. Esse programa de computador utilizou ferramentas automáticas e semi-automáticas. Os volumes (liquórico, ventricular, cerebral e cerebral total) foram contados em *voxels* usando o programa *Voxel Counter plugin do Image J* e normalizados pelo perímetro cefálico (caixa craniana) para comparar diferentes tamanhos de crânios na análise estatística. Os volumes cerebral, liquórico e ventricular também foram contabilizados em cm^3 . O volume cerebral normalizado foi medido com o uso da técnica semi-automática com correção manual de áreas não-cerebrais. O volume normalizado do líquido e carga de lesões normalizadas foram realizadas através de uma técnica de segmentação automática. Para a carga de lesões normalizadas as imagens em *FLAIR* foram selecionadas para mensuração. O volume normalizado do líquido foi medido somente através dos ventrículos laterais e dessa forma os ventrículos III e IV foram excluídos. Os volumes foram quantificados em número de *voxels* e cm^3 utilizando a ferramenta *Voxel Counter do programa Image J*.

5.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As variáveis foram tabuladas numa planilha *Microsoft Excel* e posteriormente .

analisadas por *SSPS (Statistical Package for Social Sciences- version 16.0)*. As variáveis categóricas foram sumarizadas por meio de frequências e percentagens. Para testar o padrão de distribuição das variáveis foram realizados os testes de *Kolmogorov-Smirnov* e teste de *Shapiro-Wilk*. As variáveis contínuas com distribuição assimétrica foram sumarizadas por mediana e intervalos interquartis, enquanto que aquelas com distribuição normal foram sumarizadas por média e desvio-padrão. As heterozigotas e não-heterozigotas foram comparadas em relação às seguintes variáveis: 1) na anamnese: idade no momento da avaliação, idade da menarca, idade da menopausa, número e idade dos abortamentos espontâneos, comorbidades, cirurgias e internações; 2) no exame físico: perímetro cefálico, peso e estatura; 3) na tomografia computadorizada abdominal: volume hepático (cm³), volume hepático normalizado (%), esplenomegalia, volume esplênico (cm³) e volume esplênico normalizado (%); 4) na ressonância magnética de crânio: volume cerebral normalizado (%), lesões normalizadas (%) e volume ventricular normalizado (%). Foram ainda comparadas as seguintes variáveis entre os grupos: IDS em leucócitos, IDS em plasma e excreção urinária da GAGs. As variáveis foram definidas *a priori* por meio do teste de *Mann-Whitney*. O nível de significância inicialmente adotado foi 0,05, sendo posteriormente aplicada a correção de *Bonferroni*.

6 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

6.1 AUTORIZAÇÃO PARA PESQUISA

O projeto bem como a ficha de anamnese e de exame físico foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA pelo número de protocolo 07-392 (ANEXO 1).

6.2 TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

O TCLE foi aplicado às mulheres com história familiar positiva sempre pelo mesmo pesquisador. Após o esclarecimento das dúvidas quando houve concordância em participar foi solicitada a assinatura da participante (ANEXO 2).

Em relação à idade das possíveis heterozigotas investigadas a idade mínima prevista foi de 16 anos, mas exceções (de 14 e de 15 anos) foram permitidas tendo em vista a necessidade de realização de aconselhamento genético nessa família em particular. Essas exceções foram baseadas em um dos objetivos principais de todas essas avaliações realizadas nas mulheres com história familiar positiva para MPS II, a realização do aconselhamento genético.

O aconselhamento genético e o diagnóstico de heterozigotas são motivos de freqüentes consultas nas famílias com MPS (NEUFELD; MUENZER, 2001). Especificamente para as famílias com MPS II, não existem recomendações publicadas. Já para as heterozigotas para a doença de Fabry existe na literatura um consenso internacional (BENNET *et al.*, 2002) sugerindo algumas diretrizes. Para o processo de aconselhamento ser desenvolvido, este deve ter sido solicitado pelo familiar em risco de modo voluntário e tem como objetivo fornecer todas as informações sobre a doença desde a etiologia, manejo, prognóstico, tratamento e riscos para a futura prole. A idade da realização da testagem genética em pessoas saudáveis, mas em risco de apresentarem a mesma doença familiar, é motivo de controvérsia, particularmente quando não existe terapia disponível ou, se existe quando não se tem uma idade ideal estabelecida para a intervenção terapêutica (CLARKE *et al.*, 1994).

A idade mínima para a realização da testagem genética na maioria dos estudos é citada usualmente como a partir dos 18 anos (BORRY *et al.*, 2006). No entanto outros estudos (CLARKE, 1994; BENNET *et al.*, 2002) sugerem que a testagem já poderia ser realizada em uma adolescente, que apresentasse entendimento para a realização de testagem para o estado de heterozigota assim que essa se tornasse sexualmente ativa. Dessa maneira, essa consideração foi aplicada na nossa amostra nas mulheres com história familiar positiva para MPS II.

Acreditamos, porém que cada família deva ser avaliada e que sejam respeitados todos os preceitos da bioética e, em particular o “princípio da autonomia” que está intimamente relacionado ao processo de maturidade no entendimento do processo da doença e suas potenciais decisões em relação à vida reprodutiva.

É importante ressaltar que a detecção de heterozigotas para MPS II com história familiar positiva não é considerado um teste preditivo tendo em vista que essas mulheres não se tornarão sintomáticas com o avançar da idade (LOPES-CENDES *et al.*, 2001).

Cada paciente foi identificada com um código e posteriormente as famílias foram também codificadas para que se pudesse manter o sigilo e a privacidade das informações

7 ARTIGO DE REVISÃO

7.1 EXPRESSION OF THE DISEASE ON FEMALE CARRIERS OF X-LINKED LYSOSOMAL DISORDERS: A BRIEF REVIEW

(Submetido em 10 agosto de 2009 para *Orphanet Journal of Rare Diseases*)

*Louise Lapagesse de Camargo Pinto^{1,3}, Ida Vanessa Doerdelein Schwartz^{2,3}, Taiane Alves Vieira^{3,4}, Roberto Giugliani^{1,2,3}

Adress: Rua Ramiro Barcelos 2350 3º andar Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, RS, Brazil

*corresponding author

Email: loulapagesse@ibest.com.br

¹ Postgraduate Program in Child and Adolescent Health, UFRGS, Porto Alegre, Brazil

² Department of Genetics, UFRGS, Porto Alegre, Brazil

³ Medical Genetics Service, HCPA, Porto Alegre, Brazil

⁴ Postgraduate Program in Medical Science, UFRGS, Porto Alegre, Brazil

ABSTRACT

Most lysosomal diseases are inherited as recessive traits, but two important conditions of this group have X-linked inheritance: Fabry disease and Mucopolysaccharidosis II (MPS II). These two diseases show a very different pattern regarding expression on heterozygotes. While MPS II heterozygotes are asymptomatic in

most instances, in Fabry disease the majority of the female carriers show some disease manifestation, sometimes severe. In this paper we review these two X-linked lysosomal disorders in order to discuss the mechanisms which could explain the different rates of penetrance and expressivity observed in these conditions, which could be helpful to better understand the expression of X-linked traits.

INTRODUCTION

The lysosomal disorders (LDSs) are a heterogeneous group of approximately 50 disorders [1,2] with prevalence around 1:5.000 to 1:7.000 in live births [3,4]. The disease may be due to the deficiency of a specific hydrolase, to a defect on the post-translational processing of the enzyme, to a transport defect across the lysosomal membrane, among other mechanisms involved in the degradation of macromolecules in lysosomes [2,5]. The deficiency of a single enzyme or protein causes the blockage of an entire pathway making the substrate inaccessible for further hydrolysis by other lysosomal enzymes. In most lysosomal diseases more than one compound is accumulated, as in Mucopolysaccharidosis II (MPS II) in which the main storage materials are dermatan sulphate and heparan sulphate, but other substrates like ganglioside GM2 and GM3 and subunit c of mitochondrial ATP synthase are also accumulated in brain [6]. The new concepts in cell biology led to the proposal of a new classification of LSD by Platt and Walkley [2] (Table 1).

Among the more than 600 human X-linked diseases described so far, only three are lysosomal disorders: Fabry disease (MIM 301500), MPSII II (MIM 30900), and Danon disease (MIM 300257). This review will focus on the two most frequent: Fabry disease and MPS II (Hunter disease). We will not include Danon disease, the rarest of them.

Fabry disease

Fabry disease is a rare X-linked lysosomal inborn error of glycosphingolipid catabolism resulting from the deficient activity of lysosomal hydrolase α galactosidase A (α -GAL; EC 3.2.1.22). The estimated incidence of this rare disease is 1:40.000-117.000 live

male births [4,7,8]. This figure may be underestimated, as newborn screening performed in newborn males in a Northwestern Italian region showed an incidence 1 in ~4.000 males [9]. The α -galactosidase gene (*GLA* 300644) is located in Xq22.1 and spans 12kb of DNA comprising 7 exons [8]. More than 400 mutations in the *GLA* gene have been described in Fabry patients, being most of them private [10,11,12]. The enzyme deficiency leads to a progressive accumulation of globotriaosylceramide (Gb3) and deacylated globotriaosylsphingosine (lyso-Gb3).

It is a multisystemic disorder that affects the vascular endothelium, renal glomeruli and tubules, dorsal root ganglia, cardiac myocytes, conduction tissue and valves, cornea and skin. Signs and symptoms are: angiokeratoma, progressive renal impairment, proteinuria, acropharesthesia of hands and feet, cardiac hypertrophy and conduction abnormalities, ischemic events, corneal dystrophy, hypohidrosis and impaired temperature regulation [8,11,12,13]. Figure 1 shows, respectively, a son hemizygote with Fabry disease and his mother also clinically affected.

The prevalence of females carrying the Fabry mutation was estimated as 1:339.000 in the UK [14]. Heterozygote females were usually described as asymptomatic or as exhibiting intermittent and mild symptoms of the disease [7,8]. The most common signs and symptoms found in the heterozygotes for Fabry disease are shown in Table 2 [8,14,15-19]. Deegan *et al.* [16] showed that 70% of the heterozygote females may display signs and/or symptoms. The disease in females can be severe as in male patients [7,20,21]; however, a slow rate of progression and a high phenotypic variability is more common [14,22]. Life expectancy is reduced in about 20 years in heterozygous females [23].

The measurement of the α -GAL activity cannot always allow the identification of the heterozygotes [8,23], and it is believed there is no correlation between α -GAL activity in plasma or leukocytes, genotype and severity of the clinical pictures presented by heterozygotes [2]. However, some authors stated that females with classic Fabry disease usually have lower α -GAL activity and increased urinary Gb3 levels [24]. On women suspected of presenting Fabry disease due to symptomatology or findings on a tissue biopsy, but with a negative family history, DNA analysis is often required for the definitive diagnosis [15,25]. On the other hand, Wilcox *et al.* [18] showed that leukocyte α -GAL

activity can achieve the diagnosis in 88% of females suggesting that this test, used in conjunction with urinary Gb3 measurement [26], may be an efficient way to screen females at high risk to be carriers.

Mucopolysaccharidosis type II

The incidence of MPS II is estimated between 1:110.000 and 132.500 live births [27,28]. MPS II is an X-linked recessive inborn of metabolism resulted from the deficiency of lysosomal iduronate-2-sulfatase (IDS; EC 3.1.6.13). The impaired IDS function leads to the storage of glycosaminoglicans (GAGs) in many organs and tissues. The partially degraded GAGs are heparan sulfate and dermatan sulfate, which are present in increased concentrations in patients' urine. The *IDS* gene was mapped to Xq28 and contains 9 exons that spread over 24kb [29,30]. More than 300 mutations have been described [10]. There is also a pseudogene located 20kb from the active gene [31].

This is also a multisystemic disorder, which includes the following main manifestations: coarse facies, short stature, hepatosplenomegaly, dysostosis multiplex, joint contractures, obstructive airway disease, deafness, hydrocephaly, recurrent sinopulmonary infections, valve disease and, in part of the patients, mental impairment [32]. The disease is classified as mild or severe according to the absence or presence of mental retardation [33,34]. The disease is chronic, progressive and, in its severe form, death can occurs early as age 15. Cardiac and pulmonary diseases are the most common cause of death [32]. Figure 2 shows a son with MPS II disease and his non-clinically affected heterozygote mother.

In MPS II clinical disease in females is very rare but most of the cases reported in literature have the severe phenotype [35-43] (Table 3). At least ten female cases have already been described [43].

The identification of heterozygote females for MPS II, only by measuring IDS activity, is not reliable in many cases [32,44,45]. It is suggested that the lower the value of IDS, the higher the probability that these women will be MPS II heterozygotes [32]. Unfortunately, the GAG measurement in urine is not helpful to identify carriers either [46]. Usually, the only way to achieve the definitive diagnosis is through molecular analysis [47].

X-linked inheritance was first described by Morgan [48,49] and one of the first diseases to be recognized as having this pattern of inheritance was colorblindness [48]. The classic type of an X-linked disorder usually shows a vertical transmission in which heterozygote females transmit the allele to her sons and daughters; daughters of affected males are always heterozygotes; and sons of affected males are always normal. Traditionally, these X-linked disorders are classified as having recessive or dominant inheritance. The vertical transmission through asymptomatic heterozygote women to her affected sons is recognized as X-linked recessive inheritance. On the other hand, the X-linked dominant inheritance is recognized with the vertical transmission by symptomatic daughters of affected males which transmit to both his sons and daughters [48,11].

It is true that the vast majority of mutations in X-linked genes will lead to diseases only in males [50]. However, many of the X-linked diseases show different rates of penetrance and expressivity in both genders. The following situations can be observed: 1) for some conditions, as Fabry disease, heterozygotes usually are affected, but tend to have a milder and more variable phenotype than hemizygotes; 2) for other diseases, as MPS II, penetrance in heterozygotes is very low and, consequently, very few heterozygotes are affected; 3) on the other hand, as in Vitamin D resistant rickets, penetrance and severity are high in both genders; 4) finally, as in Rett syndrome, penetrance is high in both genders, but males usually die very soon (intra-uterus) and usually only females are affected at birth [21,48,51].

Classification of X-linked disorders

According to Dobyns *et al.*[48], the traditional classification of X-linked diseases (dominant or recessive) should not be used for humans. The authors made this statement due to the fact that this classification was originally based on the *Drosophila* model, and some concepts cannot be applied to humans, since there are differences in sex determination and dosage compensation for genes on the X chromosome between the two species (Table 4). The mechanism that is responsible for dosage compensation in *Drosophila* is based on the X transcription speed, which is higher in males, and not in X-

inactivation. Therefore, a *Drosophila* female that is heterozygous for a null mutation in an X-linked gene will not present cell mosaicism as would be expected in female human cells. Based on a literature review, Dobyns *et al.*[48] classified 32 X-linked diseases according to penetrance (high, intermediate and low) and severity index (proportion of all symptomatic individuals with a phenotype classified as severe among all symptomatic carriers), both for males and females.

Fabry disease was classified as presenting high penetrance (100%) and severity index (84%) for males; for females; however, the penetrance was high (70%), unlike the severity index (4%). For MPS II, males were also found to present high penetrance (100%) and severity index (81%); females, however, were classified with both low penetrance and severity index rate. Due to the clinical heterogeneity found, these authors suggested X-linked disorders should be classified taking in account other biological mechanisms than X-inactivation and mosaicism (Table 5).

TWINNING AND X-LINKED DISEASES

Discordant phenotypes in monozygous twin females (MZF), who were heterozygous for X-linked disorders, have already been reported for many diseases, including Duchenne Muscular Dystrophy, G6PD deficiency, Haemophilia B, Fragile-X, Green-color deficiency, MPS II and Fabry disease [39,52-8]. Interestingly a concordant expression between MZF heterozygotes has never been reported [58].

Only one Fabry monozygotic female twin pair with discordant phenotype were described in literature. At age 26, the affected MZF was presented with severe signs and symptoms: renal proteinuria, angiokeratotic lesions in pelvic region and thighs, verticillate cornea and acroparesthesia in all four limbs. Both MZF were heterozygous for c.G10182A (exon5) mutation. The phenotype was attributed to the skewed X- inactivation favoring the *GLA* allele mutant on the affected MZF, showing an opposite direction in the normal MZF [52-54]. For female MZF MPS II twins also only one case has been described in literature and the affected twin demonstrate normal karyotype and skewed X- inactivation also favoring the *IDS* allele mutant [39].

Tiberio [58] reviewed some characteristics which are common to X-linked diseases in MZF: 1) karyotypes were normal; 2) one twin is severely affected and the other is spared; 3) intermediate phenotypes have not been described; 4) the X inactivation pattern is opposite to skewing (abnormal allele inactivated in most cells of the normal twin, and the normal allele inactivated in most cells of the affected twin; or skewing in one twin and random in the other twin) and 5) the disease maps into regions Xq27-28, Xp21, Xq22 and Xp22. Due to these observations three hypothesis came up to explain the discordant phenotype in these cases: 1) casual aggregation of cells carrying the same inactive chromosome that predisposes twinning [59]; 2) a “sampling effect” through early symmetric or asymmetric splitting of the inner cell mass occurring after the X inactivation [59,60] and 3) early mitotic crossing over, segregation of one crossed and one uncrossed chromatid in the daughter’s cells, and obligate inactivation of the uncrossed chromatid [61]. Unfortunately, it seems that none of these three hypothesis can completely explain the MFZ discordant for X-linked diseases [58].

The X inactivation occurs very early in embryonic life in the late blastocyst stage of embryogenesis [41,61] and one possible explanation of the variable expression of an X-linked abnormality in MZF lies on the fact that X inactivation precedes the twinning event [54,55,59,62-64]. It was also observed that in MZF who are dichorionic, twinning occurs prior or around the onset of X inactivation and, in monozygotic twins, twinning occurs later [65]. So it might be expected that discordant phenotype should be more frequent in twins dichorionic; however, anecdotal cases of discordant X-linked diseases in dichorionic MZF have already been reported [39,56]. A new explanation proposed by Monteiro *et al.* [63] is that monozygotic MZF are a heterogeneous group that differs in the timing of the twinning event after the onset of X inactivation [57].

There are many other possible explanations for discordant phenotypes between monozygotic twins: environmental causes, several embryologic mechanisms, vascular abnormalities, defect of midline structures and post-zygotic changes in the genetic material, including somatic mutations [60].

X-INACTIVATION, FABRY DISEASE AND MPS II

The main question to be answered is if skewed X inactivation is the main mechanism responsible for the different rates of penetrance and expressivity presented by heterozygous for Fabry and MPS II diseases (Table 5).

X inactivation process

The X inactivation was first described by Lyon [66,67] who suggested that the X inactivation was based on the pattern of patches in heterozygote female mice. Lyon [66,67] proposed the general rules for X inactivation: 1) normal females have just one active X chromosome; 2) X inactivation occurs early in development; 3) the X inactive can be maternal or paternal and the choice is random; d) X inactivation is irreversible in somatic cells and through all descendants. Because females have two X chromosomes and males only one, the X-inactivation provides a mechanism called “compensation dose” as a result, females are mosaic [21].

The X inactivation process is dependent on many factors and is tissue specific [50]. It is initiated on the X inactivation Center (Xic) located at Xq13.2 [68]. The X inactivation-specific transcript (*Xist*; MIM 314670) gene is the responsible for the process of *cis* inactivation [69] and it is transcribed only in the inactive X chromosome. In Xic, it is also transcribed, in the antisense orientation, the X-inactive-specific transcript-antisense (*Tsix*; MIM 300181) that has the function of regulating the early expression and the choice of which X chromosome will be inactivated [70]. As the X inactivation pattern is established, all descendants cells will have the same pattern. X inactivation in somatic cells is very stable [71] permanent and irreversible except in oogenesis and in spermatogenesis [72]. The main steps of inactivation are: counting, choice and initiation [73]. Actually, the first step is to maintain one of the X chromosome active [21] and this is attributed to the existence of an autosomal limited factor [71]. Many epigenetics modifications are necessary to guarantee the maintenance and the herdability of the X inactivation [74]. However, not all genes present in the X chromosome are inactive and about 25% of the genes [75] escape from the inactivation and most of them are located in the X chromosome short arm.

Lyonization follows the Gaussian distribution in the female population and it is expected that females must be 50:50 for genes that underwent X inactivation, but ratios 60:40 or 70:30 are the most common [76] and even 80:20 or 90:10 can be considered normal [50,65]. However, at least 5-10% of normal females present extreme skewing of X inactivation [77], while some studies showed a range between 4% to 33% [78]. Extreme skewed X inactivation is defined as affecting more than 90% of one allele [79] and may be a consequence of: 1) biases in the choice of which X chromosome to inactivate; 2) X chromosome mutations or rearrangements which affect the viability of cells with one or the other active X; or 3) stochastic factors [71,76]. Highly skewed X inactivation, defined as more than 80:20 are considered to be pathogenic [80].

Studies in peripheral blood cells show that skewing of inactivation increases with age but the practical significance is uncertain. However, it is possible that the skewing in an advanced age is correlated with the presence of a pathogenic allele in the X chromosome [76]. The age-skewing process can be caused by stochastic clonal loss of hematopoietic cells [81] or competitive advantage for hematopoietic stem cells with a specific genotype of X-linked genes [82].

Skewed X-inactivation and diseases

Traditionally, the main mechanisms that are said to influence the expression of the X-linked disorders are: skewed inactivation [43,67,83,84], clonal expansion and somatic mosaicism [85]. Therefore, heterozygote females for X-linked diseases can manifest signs and symptoms if: 1) the mutation confers a proliferative advantage to the mutant cells; 2) the mutant is in the X chromosome active [36,43,85]; 3) full X monosomy is present; 4) uniparental disomy for the mutant X chromosome is present [39]; 5) the mutation is located at the *XIST* gene [65] and 6) there is no cross-correction between cells that present normal or deficient enzyme activity [21].

As mentioned before, skewed X inactivation has been shown to be responsible for clinical manifestations in female carriers of X-linked diseases such as Duchenne muscular dystrophy [55]. However, skewed X inactivation also seems to be involved in other situations such as: recurrent pregnancy loss [86,87] and breast cancer [88]. Deviation from

X inactivation can be primary or secondary. Primary as result of the deviation of X inactivation itself, e.g. a mutation in *XIST* gene; or secondary if the non-random X inactivation has a consequence like cell selection [22,89].

It is possible to identify four X inactivation patterns in heterozygotes for X -linked diseases: 1) random inactivation is usually associated with normal phenotype; 2) random inactivation leads to manifestations in a continuum spectrum and normal phenotype requires skewing favoring the normal allele in the expressing tissue; 3) skewing always extreme as mutant cells dies or fails to develop, or migrate to destination; or 4) gradual skewing because of cell selection due to a proliferative advantage of wild type (or mutant) cells expressing tissue [21].

Unbalanced X inactivation can occur as stochastic variation, or due to genetic factors influencing the X inactivation itself or due to post-inactivation selection mechanism [22]. The first two are rare and occur independent of the kind of mutation in the gene of the disease [22,65].

FABRY DISEASE- EXPLANATIONS FOR THE FEMALE PHENOTYPE

Symptomatic heterozygous females for Fabry disease can be as frequent as 60-70% [22,90]. Sometimes, symptoms are as severe as in males [7,90]. It has been suggested that X inactivation studies could be helpful in predicting the female phenotype in Fabry disease [11,22]. For some authors [8,15,23] skewed X inactivation plays an essential role in the phenotype expression in heterozygotes of Fabry disease. Dobrovolny *et al.* [11] showed that some females with preferential X inactivation have more rapid disease progression, and suggested that X inactivation is the major factor for determining the severity of clinical involvement and the morbidity in Fabry heterozygotes.

However, for other authors [51], the phenotype was not due to skewed X inactivation and the severity was not correlated with the deviation either. They concluded that the X inactivation in leukocytes in females with Fabry disease is not useful to predict the prognostic and should not be used to determinate therapeutic options. Also the disease

progression was related to the cross correction with a decreasing efficiency throughout the years, which would explain the fact that heterozygote females for Fabry disease are more symptomatic as time goes by [22].

The cross-correction mechanism is also called metabolic cooperation. The lysosomal enzymes freely enter and leave the lysosomes and are transferred from one cell to another by manose-6-phosphate-mediated endocytosis. When the enzyme is deficient, the non digested products accumulate in the lysosome [85]. In Fabry disease, either the amount of active enzyme secreted may be insufficient or the secreted enzyme is not adequately taken up by normal cells, thus this is not enough to an adequate cross-correction [16,21,85].

The last observation is suggested by the fact that the activity of the enzyme in plasma or leukocytes may not reflect the situation within the lysosome of relevant cell types of Fabry disease, which suggests that the uptake of normal cells may be defective [12,16]. It seems that a distinct pattern of recaptation due to the mannose-6-phosphate receptors and the localization in the enzyme can be responsible for a lower-uptake enzyme and consequently some females will manifest the disease [85]. Another hypothesis is related to a new concept (“cross-induction”): increased levels of plasma lyso-Gb3 (a deacylated form of Gb3) were found in symptomatic heterozygotes for Fabry disease, and appear to be positively correlated with the severity of the clinical picture [91]. If this is true, maybe lyso-Gb3 is widely diffusible, and has the capacity to inhibit α -GAL activity produced by cells which have an active non-mutated X-chromosome, therefore leading to clinical symptomatology in most heterozygotes.

Other factors affect the expression in Fabry disease: 1) the nature of the mutation – and correlation with enzyme activity [15] and 2) the blood group - patients of blood groups B and AB are more severely affected than individuals of other groups [8], probably because these patients accumulate, in addition to globotriaosylceramide and galabiosylceramide, two further glycosphingolipids [15].

MPS II DISEASE – EXPLANATION FOR FEMALE PHENOTYPE

Different from the Fabry carriers, heterozygote MPS II females are spared from the disease. But why? It may be attributed to the cross-correction of cells in which the active X is the one with the mutation by the functional enzyme secreted by cells in which the non-mutant gene is active [92]. Schwartz, 2008 [93] suggested that in some cells of MPS II carriers, like chondrocytes or hepatocytes, the X chromosome carrying the mutant allele would be preferentially inactive or would reduce the cell viability. Consequently MPS II heterozygous females are rarely affected unless a coincidental genetic defect happens, such as X-chromosome translocation or a simultaneous presence of two mutant alleles. In fact, in MPS II the most likely explanation is that skewed X inactivation is the responsible for the clinical and biochemical phenotypes presented by the severe affected female patients [32], but there is not enough data in literature to confirm this hypothesis.

CONCLUDING REMARKS/THE FUTURE

Most females are mosaics, having a mixture of cells expressing either their mother's or father's X-linked genes. Often, cell mosaicism is advantageous, ameliorating the deleterious effects of X-linked mutations and contributing to the physiological diversity. Although sometimes mosaicism brings a significant biological advantage, the outcome is never certain [85].

It is interesting that although Fabry disease and MPS II are both lysosomal X-linked disorders, they show many differences in the clinical expression of heterozygous females. The main differences, at the moment, can be explained by: 1) the cross-correction or cross-inducing mechanisms; 2) the skewed X inactivation [21].

As proposed by Dobyns *et al.* [48] the X-linked diseases show a continuum in penetrance and new rules must be established to explain the various phenotypes observed. Despite the fact that there has been more than 30 years since the discovery of the existence of the X inactivation mechanism, we still have a lot to learn, and new information about cell biology is still needed to allow us to provide a more precise genetic counseling to affected families.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

All the authors contributed to this review. They read and approved the final version of the article.

Acknowledgments

The authors of this work are grateful for the fellowships provided by CAPES through the Postgraduate Program in Child and Adolescent Medicine/UFRGS (LLP) CNPq (RG and IVS) and FIPE. Also we would like to thank to Dr. Cristina Netto for their assistance.

REFERENCES

1. Wraith JE: **Lysosomal disorders.** *Semin Neonatol* 2002, **7**:75-83.
2. Platt FM, Walkley SU: *Lysosomal Disorders of the Brain.* Great Britain: Oxford University Press; 2004.
3. Meikle PJ, Hopwood JJ: **Lysosomal storage disorders: emerging therapeutic options require early diagnosis.** *Eur J Pediatr* 2003, **162** (Suppl 1):S34-37.
4. Meikle PJ, Hopwood JJ, Clague AE, Carey WF: **Prevalence of lysosomal disorders.** *JAMA* 1999, **281**:249-254.
5. Wraith JE: **Advances in the treatment of lysosomal storage disease.** *Dev Med Child Neurol* 2001, **43**:639-646.
6. Ballabio A, Gieselmann V: **Lysosomal disorders: from storage to cellular damage.** *Biochim Biophys Acta* 2009, **1793**:684-696.
7. Gibas AL, Klatt R, Johson J, Clarke JTR, Katz J: **Disease rarity carrier status and gender: a triple disadvantage for women with Fabry disease.** *J Genet Couns* 2008, **17**:528-537.
8. Desnick RJ, Ioannou YA, Eng CM: **α galactosidase A deficiency: Fabry disease.** In the metabolic and molecular basis of inherited disease. Volume III. 8th edition. Edited by Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D. New York: MacGraw-Hill; 2001:3773-3774.
9. Spada M, Pagliardini S, Yasuda M, Tükel T, Thiagarajan G, Sakuraba H, Ponzzone A, Desnick RJ: **High incidence of later-onset Fabry disease revealed by newborn screening.** *Am J Hum Genet* 2006, **79**:31-40.
10. The Human Gene Mutation Database at the Institute of Medical Genetics in Cardiff [<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>]
11. Dobrovolny R, Dvorakova L, Ledvina J, Magagge S, Bultas J, Lubanda JC, Elleder M, Karetova D, Pavlikova M, Hrebicek M: **Relationship between X inactivation and clinical involvement in Fabry heterozygotes. Eleven novel mutations in the α Galactosidase A gene in the Czech and Slovak population.** *J Mol Med* 2005, **83**:647-654.
12. Atul Mehta, Michael Beck, Gere Sunder-Plasmann: *Fabry disease perspectives from 5 years of FOS.* United Kingdom: OXFORD Pharmagenesis; 2006.
13. MacDermot KD, Holmes A, Miners AH: **Natural history of Fabry disease in affected males and obligate carrier females.** *J Inherited Metab Dis* 2001, **24**(Suppl 2):13-14.
14. MacDermot KD, Holmes A, Miners AH: **Anderson-Fabry disease: clinical manifestations and impact of disease in a cohort of 60 obligate Carrier females.** *J Med Genet* 2001, **38**:769-775.

15. Whybra C, Kapmann C, Willers I, Davies J, Winchester B, Kriegsmann J, Bruhl K, Gal A, Bunge S, Beck M: **Anderson-Fabry disease: clinical manifestations of the disease in female heterozygotes.** *J Inherit Metab Dis* 2001, **24**:715-724.
16. Deegan PB, Bahner F, Barba Romero MA, Hughes DA, Kapmann C, Beck M and on behalf of European FOS Investigators: **Natural history of Fabry disease in females in the Fabry Outcome Survey.** *J Med Genet* 2005, **43**:347-352.
17. Nagasaki A, Nishie W, Sato K, Oba I, Noguchi E, Akitsu H, Sawamura D, Shimizu H: **Clinical and genetic analysis of Fabry disease: report of six cases including three heterozygotes females.** *J Dermatol Sci* 2008, **52**:61-64.
18. Wilcox WR, Oliveira JP, Hopkin RJ, Ortiz A, Banikazemi M, Feldt-Rasmussen U, Sims K, Waldek S, Pastores GM, Lee P, Eng CM, Marodi L, Standford KE, Breunig F, Wanner C, Warnock DG, Lemay RM, Germain DP: **Females with Fabry disease frequently have a major organ involvement: lessons from the Fabry Registry.** *Mol Genet Metab* 2008, **93**:112-12.
19. Kobayashi M, Ohashi T, Sakuma M, Ida H, Eto Y: **Clinical manifestations and natural history of Japanese heterozygous females with Fabry disease.** *J Inherited Metab Dis* 2008, in press.
20. Baehner F, Kapmann C, Whybra C, Miebach E, Wiethoff CM, Beck M: **Enzyme replacement therapy in heterozygous females with Fabry disease: results of a phase IIB study.** *J Inherited Metab Dis* 2003, **26**:617-27.
21. Migeon BR: *Females are Mosaics: X inactivation and sex differences in disease.* New York: Oxford University Press; 2007.
22. Maier EM, Osterrieder S, Whybra C, Ries M, Gal A, Beck M, Roscher AA, Muntau AC: **Disease manifestations and X inactivation in heterozygous females with Fabry disease.** *Acta Paediatr* 2006, **95**(Suppl):30-38.
23. Mehta A, Ricci R, Widmer U, Dehout F, Garcia de Lorenzo A, Kapmann C, Linhart A, Sunder-Plasmann G, Ries M, Beck M: **Fabry disease defined: baseline clinical manifestations of 366 patients in the Fabry Outcome Survey.** *Eur J Clin Invest* 2004, **34**:236-342.
24. Kitagawa T, Suzuki K, Ishige N, Ohsahi T, Kobayashi M, Eto Y, Tanaka A, Odaka H, Owada M: **Non-invasive high-risk screening for Fabry disease hemizigotes and heterozigotes.** *Pediatr Nephrol* 2008, **23**:1461-1471.
25. Linthorst GE, Poorthuis BJ, Hollak CE: **Enzyme activity for determination of presence of Fabry disease in women results in 40% false-negative results.** *J Am Coll Cardiol* 2008, **51**: 2082-2083.
26. Kitagawa T, Ishige N, Suzuki K, Owada M, Ohsahi T, Kobayashi M, Eto Y, Tanaka A, Mills K, Winchester B, Keutzer J: **Non-invasive screening method for Fabry disease by measuring globotriacylceramide in whole urine samples using tandem mass spectrometry.** *Mol Genet Metab* 2005, **85**:196-202.

27. Machili G, Barbujani G, Danieli GA, Hermann FH: **Segregation and sporadic cases in families with Hunter's syndrome.** *J Med Genet* 1991, **28**: 398-401.
28. Nelson J, Crowhust J, Carey B, Greed L: **Incidence of the mucopolysaccharidosis in Western Australia.** *Am J Med Genet* 2003, **123A**:310-313.
29. Wilson PJ, Meaney CA, Hopwood JJ, Morris CP: **Sequence of the human iduronate 2-sulfatase (IDS) gene.** *Genomics* 1993, **17**:773-775.
30. Flomen RH, Green EP, Green PM, Bentley DR, Giannelli F: **Determination of the organization of coding sequences within the iduronate sulphate (IDS) gene.** *Hum Mol Genet* 1993, **2**:5-10.
31. Timms Km, Lu F, Shen Y, Pierson CA, Muzny DM, Nelson DL, Gibbs RA: **130 kb of DNA sequence reveals two new genes and a regional duplication distal to the human iduronate-2-sulfaatse locus.** *Genome Res* 1995, **5**:71-78.
32. Neufeld EF, Muenzer J: **The Mucopolysaccharidoses.** In *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease*. Volume III. 8th edition. Edited by Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D. New York: MacGraw-Hill; 2001:3421-3452.
33. Young ID, Harper PS, Archer IM, Newcombe RG: **A clinical and genetic study of Hunter's syndrome 1. Heterogeneity.** *J Med Genet* 1982, **19**:401-407.
34. Young ID, Harper PS, Archer IM, Newcombe RG: **A clinical and genetic study of Hunter's syndrome 2. Differences between the mild and severe forms.** *J Med Genet* 1982, **19**:408-411.
35. Neufeld EF, Liebaers I, Epstein CJ, Yatziv S, Milunsky A, Migeon BR: **The Hunter syndrome in females: is there na autosomal recessive form of iduronate sulfatase deficiency?** *Am J Hum Genet* 1977, **29**:455-456.
36. Mosmann J, Blunt S, Stephens R, Jones EE, Pembrey M: **Hunter's disease in a girl: association with X:5 chromosomal translocation disrupting the Hunter gene.** *Arch Dis Child* 1983, **58**:911-915.
37. Broadhead DM, Kirk JM, Burt AJ, Gupta V, Ellis PM, Besley GT: **Full expression of Hunter's disease in a female with an X-chromosome deletion leading to non-random inactivation.** *Clin Genet* 1986, **20**:392-398.
38. Clarke JT, Greer WL, Strasberg PM, Pearce RD, Skomorowski MA, Ray PN: **Hunter disease (mucopolysaccharidosis type II) associated with unbalanced inactivation of X chromosomes in a karyotypically normal girl.** *Am J Hum Genet* 1991, **49**:289-297.
39. Winchester B, Young E, Geddes S, Genet S, Hurst J, Middleton-Price H, Williams N, Webb M, Habel A, Malcom S: **Female twin Hunter disease due to nonrandom inactivation of the X-chromosome: a consequence of twinning.** *Am J Med Genet* 1992, **1**:44:834-838.

40. Sukegawa K, Song XQ, Masuno M, Fukao T, Shimozawa N, Fukuda S, Isogai K, Nishio H, Matsuo M, Tomatsu S, Kondo N, Orii T: **Hunter disease in a girl caused by R468Q mutation in the iduronate-2-sulfatase gene and skewed inactivation of the X chromosome carrying the normal allele.** *Hum Mut* 1997, **10**:316-317.
41. Sukegawa K, Matsuzaki T, Fukuda S, Masuno M, Fukao T, Kokutyu M, Iwata S, Tomatsu S, Orii T, Kondo N: **Brother/sister sibilings affected with Hunter disease: evidence for skewed X chromosome inactivation.** *Clin Genet* 1998, **53**:96-101.
42. Cudry S, Tigaud I, Frossairt R, Bonnet V, Maire I, Bozon D: **MPS II in females: molecular basis of two different cases.** *J Med Genet* 2000, **37**:E29.
43. Tuschl K, Gal A, Paschke E, Kircher S e Bodamer OA: **Mucopolysaccharidosis type II in females case report and review of literature.** *Pediatr Neurol* 2005, **32**:270-272.
44. Zlogotora J, Bach G: **Heterozygote detection in Hunter syndrome.** *Am J Med Genet* 1986, **17**:661-665.
45. Adinolfi M: **Hunter syndrome: cloning of the gene, mutations and carriers detection** *Dev Med Neurol* 1993, **35**:79-85.
46. Schwartz IVD: **Estudo clínico, bioquímico e genético de pacientes com mucopolissacaridoses II e de possíveis heterozigotas.** *PhD tesis.* Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Departamento de Genética e Biologia Molecular; 2004.
47. Wraith JE, Scarpa M, Beck M, Bodamer AO, De Meileir L, Guffon N, Meldgaard Lund A, Malm G, Van der Ploeg AT, Zeman J: **Mucopolysaccharidosis type II (Hunter syndrome): a clinical review and recommendations for treatment in the era of enzyme replacement therapy.** *Eur J Pediatr* 2008, **167**:267-277.
48. Dobyns WB, Filauro A, Tomson BN, Chan AS, Ho AW, Ting NT, Osterwijk JC, Ober C: **Inheritance of most X-linked traits is not dominant or recessive, just X-linked.** *Am J Med Genet* 2004, **129A**:136-143.
49. Morgan TH (Ed): Croonian Lecture- On the mechanism of heredity. *Proceeding of the Royal Society*; 1st June 1922, New York 94:162-197
50. Willard 2000 HF: **The sex chromosomes and X chromosome inactivation.** In the metabolic and molecular basis of inherited disease. Volume III. 8th edition. Edited by Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D. New York: MacGraw-Hill:1191-1211
51. Chabas A, Happle R: **Understanding the biology of X linked diseases.** *Acta Paediatr* 2006, **451** (Suppl) **95**:9-10.
52. Redonnet-Vernhet I, Ploss van Amstel JK, Jansen RPM, Wevers RS, Salvayre R, Levade T J: **Uneven X inactivation in a female monozygotic twin pair with Fabry disease and discordant expression of a novel mutation in the alpha-galatosidase A gene.** *J Med Genet* 1996, **33**:682-688.

53. Levade T, Giordano F, Maret A, Margery MC, Bazex J, Salvayre R: **Different phenotypic expression of Fabry disease in female monozygotic twins.** *J Inherited Metab Dis* 1991, **14**:105-16
54. Marguery MC, Giordano F, Parant M, Samalens G, Levade T, Salvayre R, Maret A, Clavas P, Bourrouillou G, Cantala P, Bazex J: **Fabry's Disease: Heterozygous form of different expression in two monozygous twin sisters.** *Dermatology* 2003, **187**:9-15.
55. Richards CS, Watkins SC, Hoffman EP, Schneider NR, Mildark IW, Katz KS, Cook JD, Kunkel LM, Cortada JM: **Skewed X inactivation in a female MZ twin results in Duchene muscular dystrophy.** *Am J Hum Genet* 1990, **46**:672-681.
56. Lupski JR, Garcia CA, Zoghbi HY, Hoffmann EP, Fenwick RG: **Discordance of muscular dystrophy in monozygotic female twins: evidence supporting asymmetric splitting of the inner cell mass in a manifesting carrier of Duchene Dystrophy.** *Am J Hum Genet* 1991, **40**:354-364.
57. Valleix S, Vinciguerra C, Lavergne JM, Leuer M, Delpech M, Negrier C: **Skewed X-chromosome inactivation in monozygotic diamniotic twin sisters results in severe and mild hemophilia A.** *Blood* 2002, **100**:3034-3036.
58. Tiberio G: **MZ females twins discordant for X-linked diseases: a review.** *Acta Genet Med Gemellol* 1994, **43**:207-214.
59. Burn J, Povey S, Boyd Y, Munro EA, West L, Harper K, Thomas D: **Duchene muscular dystrophy in one of monozygotic twin girls.** *J Med Genet* 1986, **23**:494-500.
60. Nance WE: **Do twin Lyons have large spots?** *Am J Hum Genet* 1990, **46**:646-648.
61. Côté GB and Gyftodimou J: **Twinning and mitotic crossing-over: some possibilities and their implications.** *Am J Hum Genet* 1991, **47**:120-130.
62. Gardner RL, Lyon MF, Evans EP, Burtenshaw MD: **Clonal analysis of X-chromosome inactivation and the origin of the germ line in the mouse embryo.** *J Embryol Exp Morphol* 1985, **88**:349-363.
63. Monteiro J, Derom C, Vlietinck R, Kohn N, Lesser M, Gregerson PK: **Commitment to X inactivation precedes the twinning event in monozygotic MZ twins.** *Am J Hum Genet* 1998, **63**:339-346.
64. Chitnis S, Derm C, Vlietinck R, Deron R, Monterio J, Gregersn PK: **X chromosome inactivation patterns confirm the late timing of monoamniotic MZ twinning.** *Am J Hum Genet* 1999, **65**:570-571.
65. Puck JM, Willard HF: **X inactivation in females with X linked disease.** *N England J Med* 1998, **330**:325-328.
66. Lyon MF: **Gene Action in the X-chromosome of the Mouse (*Mus musculus L.*).** *Nature* 1961, **190**: 372 – 373.

67. Lyon MF: **Sex chromatin and gene action in the mammalian X-chromosome.** *Am J Hum Genet* 1962, **14**:135-148.
68. Brown CJ, Lafreniere RG, Powers VE, Sebastio G, Ballabio A, Pettigrew AL, Ledbetter DH, Levy DH, Levy E, Craig IW, Willard HF: **Localization of the X-inactivation centre on the human X chromosome in Xq13.** *Nature* 1991, **349**:82-84.
69. Willard HF: **X chromosome inactivation, XIST, and pursuit of the X inactivation center.** *Cell* 1996, **86**: 5-7.
70. Lee JT, Lu N: **Targeted mutagenesis of Tsix leads to nonrandom X inactivation.** *Cell* 1999, **99**: 47-57.
71. Brown CJ and Robinson WP: **The causes and consequences of random and non-random X chromosome inactivation in humans.** *Clin Genet* 2000, **58**:353-363.
72. Salido EC, Yen PH, Mohandas TK, Shapiro LJ: **Expression of the X-inactivation-associated gene associated XIST during spermatogenesis.** *Nat Genet* 1992, **2**:196-199.
73. Avner P, Heard E: **X-chromosome inactivation: counting, choice and initiation.** *Nat Rev Genet* 2001, **2**:59-67.
74. Heard E, Rougeulle C, Arnaud D, Avner P, Allis CD, Spector DL: **Methylation of histone H3 at Lys-9 is an early mark on the X chromosome during X inactivation.** *Cell* 2001, **107**:727-738.
75. Talebizadeh Z, Simon SD, Butler MG: **X chromosome gene expression in human tissues: male and female comparisons.** *Genomics* 2006, **88**:675-681.
76. Busque L, Mio R, Mattioli, Brais E, Blais N, Lalonde Y, Maragh M, Gilliland DG: **Non-random X inactivation patterns in normal females: lyonization ratios vary with age.** *Blood* 1996, **88**: 59-65.
77. Naumova AK, Plenge RM, Bird LM, Leppert M, Morgan K, Willard HF, Sapienza C: **Heritability of X chromosome-inactivation phenotype in a large family.** *Am J Hum Genet* 1996, **58**:1111-1119.
78. Fey MF, Liechti-Gallati S, von Rohr A, Borisch B, Theirlkas L, Schneider V, Oestreicher M, Nagel S, Ziemiecki A, Tobler A: **Clonality and X-inactivation patterns in hematopoietic cell populations detected by the highly informative M27 beta probe.** *Blood* 1994, **83**:931-938.
79. Sharp A, Robinson D, Jacobs P: **Age-and tissue specific variation of X chromosome inactivation ratio in normal women.** *Hum Genet* 2000, **107**:343-347.
80. Lyon MF: **X-chromosome inactivation and human genetic disease.** *Acta Paediatr Suppl* 2002, **91**:107-112.
81. Gale RE, Fielding AK, Harrison CN, Linch DC: **Acquired skewing of X-chromosome inactivation patterns in myeloid cells of the elderly suggests stochastic clonal loss with age.** *Br J Haematol* 1997, **98**:512-519.

82. Kristiansen M, Knudsen GP, Bathum L, Naumova AK, Sorensen TI, Brix TH, Svendsen AJ, Christensen K, Kyvik KO, Orstavik KH: **Twin study of genetic and aging effects on X chromosome inactivation.** *Eur J Hum Genet* 2005, **13**: 599-606.
83. Maier EM, Kammer S, Muntau AC, Wichers M, Braun A, Roscher AA: **Symptoms in carriers of adrenoleukodystrophy relate to skewed X inactivation.** *Ann Neurol* 2002, **52**:683-688.
84. Plenge RM, Stevenson RA, Lubs HA, Schwartz CE, Willard HF: **Skewed X-chromosome inactivation is a common feature of X-linked mental retardation disorders.** *Am J Hum Genet* 2002, **71**:168-173.
85. Migeon BR: **The role of X inactivation and cellular mosaicism in women's health and sex specific diseases.** *JAMA* 2006, **295**:22-29.
86. Uehara S, Hashiyada M, Sato K, Sato Y, Fujimori K, Okamura K: **Preferential X-chromosome inactivation in women with idiopathic recurrent pregnancy loss.** *Fertil Steril* 2001, **76**:908-914.
87. Lanasa MC, Hogge WA, Kibik C, Blancato J, Hoffman EP: **Highly skewed X-chromosome inactivation is associated with idiopathic recurrent spontaneous abortion.** *Am J Hum Genet* 1999, **65**:252-254.
88. Kristiansen M, Knudsen GP, Maguire P, Margolin S, Pedersen L, Lindblom A, Orstavik KH: **High incidence of skewed X chromosome inactivation in young patients with familial non-BRCA1/BRCA2 breast cancer.** *J Med Genet* 2005, **42**:877-880.
89. Belmont JW: **Genetic control of X inactivation and process leading to X inactivation skewing.** *Am J Hum Genet* 1996, **58**:1101-1108.
90. Wang RY, Lelis A, Mirocha J, Wilcox WR: **Heterozygotes Fabry women are not just carriers, but have a significant burden of disease and impaired quality of life.** *Genet Med* 2007, **9**:34-45.
91. Aerts JM, Groener JE, Kuiper S, Donker-Koopman WE, Strijland A, Ottenhoff R, van Roomen C, Mirzaian M, Wiljburg FA, Linthorst GE, Vedder AC, Rombach SM, Cox-Brinkmann J, Somerharju P, Boot RG, Hollak CE, Brady RO, Poorthuis BJ: **Elevated globotriaosylsphingosine is a hallmark of Fabry disease.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2008, **105**:2812-2817.
92. Braun SE, Arnovich EL, Anderson RA, Crotty PL, Mc Ivor RS, Whitley CB: **Metabolic correction and cross-correction of mucopolysaccharidosis type II (Hunter syndrome) by retroviral-mediated gene transfer and expression of human iduronate-2-sulfatase.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993, **90**:11830-11834.
93. Schwartz IVD, Pinto LLC, Ribeiro MG, Mota JG, Acosta AX, Correia P, Horovitz D, Porciuncula CGG, Lipinski-FigueiredoE, Fett-Conte A, Oliveira Sobrinho RP, Norato DYJ, Paula AC, Kim CA, Duarte AR, Boy R, Leistner-Segal S, Burin MG, Giugliani R: **Clinical and Biochemical Studies in Mucopolysaccharidosis type II Carriers.** in press.



Figure 1. Male patient with Fabry disease (left, child) and a heterozygote for Fabry disease (right, mother). The male patient is 21 years old and presents with pain in hands and achroparestesias temperature intolerance, hypohidrosis and proteinuria. He presents a 30delG in the α GAL gene. The mother is 62 years old and has diabetes mellitus, cardiopathy and proteinuria. She is a carrier for 30delG in the α GAL gene. Images authorized by patients.



Figure 2. Male patient with MPS II (left, child) and a heterozygote for MPS II (left, mother). The patient is 10 years old and presents severe mental handicap, coarse face, hepatosplenomegaly, dysostosis multiplex, joint contractures, obstructive airway disease, mitral regurgitation, deafness and hydrocephaly. He presents a total deletion of *IDS* gene. The mother is a MPS II carrier and is asymptomatic. Images authorized by patients.

Table 1. Classification of LSDs (adapted from Platt and Walkley, 2004)

Molecular defect	Enzyme deficiency	Disease example	OMIM number
Primary lysosomal hydrolase defect	α -Galactosidase A	Fabry disease	301500
	Iduronate-sulfatase	MPS II	309900
Post-translational processing defect of lysosomal enzymes	Multiple sulphatase deficiency (12 sulphatases)	Multiple sulphatase deficiency	272200
Trafficking defect for lysosomal enzymes	N-acetylglucosamine-1-phosphotransferase	Mucopolipidosis type II	252500
Defect in lysosomal enzyme protection	β -Galactosidase and Neuraminidase deficiency	Galactosialidosis	256540
Defect insoluble non-enzymatic lysosomal proteins	Hexosaminidase activator deficiency	GM2 type AB (Tay-Sachs disease variant AB)	272750
Transmembrane (non-enzyme) protein defect	Lysosomal-associated membrane protein 2	Danon disease	300257
Unclassified	Intracellular accumulation of autofluorescent of lipopigments storage material	Neuronal ceroid lipofuscinoses (CLN4)	204300

Table 2. Signs and symptoms in Fabry heterozygotes: review of the literature

Report	n	X Inactivation	Age (years)	Neuropathic Pain (%)	Angiokeratomas (%)	Proteinuria (%)	Cardiac Abnormalities (%)	Verticillate Cornea (%)	Isquemic Events (%)
Desnick <i>et al</i> , 2001	122	NI	1-85	<10	30	<1**	<1	70	<1
MacDermont <i>et al</i> , 2001	60	NI	>18	70	35	31.5	90	NI	6.7
Whybra <i>et al</i> , 2001	20	NI	20	90	55	55	55	70	75 †
Deegan <i>et al</i> , 2005	248	NI	38.2+/-18	77	40	35	59	40	7
Nagasaki <i>et al</i> , 2007	3	NI	43-55	100	100	66,6	NI	NI	0
Kobayashi <i>et al</i> , 2008	36	NI	4-68	50	5.6	38.9	38.9***	50*	8.3
Wilcox <i>et al</i> , 2008	1077	NI	0>50	43.3	17.8	10.6	10	12.5*	4.2

NI= not informed; *Non specified ocular abnormalities; ** renal failure; ***left ventricular hypertrophy; † MRI was done in 4/20 women

Table 3. Female patients with Hunter syndrome (based on Tuschl *et al.* 2004)

Reference	X Inactivation	Karyotype	Mutation	Twins	Form
Neufeld <i>et al.</i> 1977 ¹	Not Tested	46,XX	Nd*	No	Neuronopathic
Mossmann <i>et al.</i> 1983	Skewed ²	46,XX t(X;5)**	Nd	No	Neuronopathic
Broadhead <i>et al.</i> 1986	Skewed ²	delXq25	Nd	No	Neuronopathic
Clarke <i>et al.</i> 1991	Skewed ²	delXq27-28	3-5cM-deletion	No	Neuronopathic
Winchester <i>et al.</i> 1992	Skewed ²	46,XX	Nd	Yes	Neuronopathic ***
Sukegawa <i>et al.</i> 1997	Skewed ²	46,XX	p.R468Q/N	No	Neuronopathic
Sukegawa <i>et al.</i> 1998	Skewed ²	46,XX	p.R468L/N	No	Neuronopathic
Cudry <i>et al.</i> 2000 (case a)	Skewed ²	46,XX	p.L4IP/ L4IP	No	Non Neuronopathic
Cudry <i>et al.</i> 2000 (case b)	Skewed ²	46,XX	[g.17419del3254+g.17418ins20]	No	Neuronopathic
Tuschl <i>et al.</i> 2004	Skewed ²	46,XX	[c.706_719del+c.705_720insG]	No	Neuronopathic

Nd* not determined; ** 46,XX t(X;5)(q27?;q3?1)(q26?;q3?2) ***She was at school at age eleven, with an average intellectual ability;¹ The author reported 2 cases that were initially diagnosed with MPS II but one of them was further diagnosed with multiple sulfatase deficiency; Data not shown²

Table 4 .Comparison between *Drosophila* and human regarding dose compensation mechanism*

Characteristics	<i>Drosophila</i>	Human
Female	6A+XX	46, XX
Male	6A+XY	46, XY
Fertile	6A+XX and 6A+XY	46, XX and XY
Infertile	6A+XO	45, X
Dosage compensation in X chromosome	Transcribing rate of the X chromosome	X-inactivation
X inactivation	No	Yes

*Based on Dobyns *et al.* 2004

Table 5. Summary of some biological mechanisms proposed by Dobyns *et al.* 2004 (based on Dobyns *et al.*, 2004)

Type of gene product	Gene product cause early cell death	Heterozygotes Phenotype	Probaly X-inactivation Pattern	Diseases
Gene products that are cell-autonomous	No	Normal Abnormal	Random* or skewed favorable to the normal allele** Random	Fabry disease Duchene Muscular Dystrophy
Gene products that are non-cell-autonomous ¹ or functionally non-autonomous ²	No	Normal Abnormal	Random Skewed favorable to the abnormal allele	MPS II

¹ *Non-autonomous genes products would include primarily secreted proteins;*

² *Functionally non-autonomous would include proteins expressed in non-clonal multinucleated cells and small molecules that pass freely between cells*

**For females without affected children at diagnosi, but with affected relatives;*

***For females with affected children*

7.2 EXPRESSÃO DAS DOENÇAS LISSÔMICAS LIGADAS AO CROMOSSOMO X NAS HETEROZIGOTAS: UMA BREVE REVISÃO

1 – Local de realização do trabalho: Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brasil

2 – Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2350 - Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brasil loulapagesse@ibest.com.br

Louise Lapagesse de Camargo Pinto^{1,3}, Ida Vanessa Doerdelein Schwartz^{2,3}, Taiane Alves Vieira^{3,4}, Roberto Giugliani^{1,2,3}

¹ Programa de Pós Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente, UFRGS, Porto Alegre, Brasil

² Departamento de Genética e Biologia Molecular, UFRGS, Porto Alegre, Brasil

³ Serviço de Genética Médica, HCPA, Porto Alegre, Brasil

⁴ Programa de Pós Graduação em Ciências Médicas, UFRGS, Porto Alegre, Brasil

RESUMO

A maioria das doenças lisossômicas são herdadas de modo recessivo, mas duas condições importantes deste grupo têm um modo de herança ligada ao cromossomo X: Doença de Fabry e Mucopolissacaridose II (MPS II). Estas duas doenças apresentam um padrão muito diferente de expressão nas heterozigotas. Enquanto heterozigotas para MPS II são assintomáticas na maioria dos casos, na doença de Fabry a maioria das mulheres heterozigotas apresentam alguma manifestação da doença, algumas vezes com maior gravidade. Neste artigo nós revisamos estas duas doenças lisossômicas ligadas ao cromossomo X para discutir o mecanismo pelo qual as diferenças na penetrância e

expressividade observadas poderiam ser explicadas nessas condições, levando a um melhor entendimento da expressividade das doenças ligadas ao cromossomo X.

INTRODUÇÃO

As doenças lisossômicas (DLDs) são um grupo heterogêneo de aproximadamente 50 enfermidades [1,2] com prevalência em torno de 1:5,000 a 1:7,000 nascidos vivos [3,4]. A doença pode ser causada pela deficiência de uma enzima hidrolase específica, por um defeito no processamento da enzima pós-tradução ou por um defeito de transporte através da membrana lisossomal, entre outros mecanismos envolvidos na degradação de macromoléculas nos lisossomos [2,5]. Na maioria dos casos, a deficiência de uma única enzima ou proteína causa um bloqueio de uma rota metabólica inteira, tornando o substrato inacessível para futuras hidrolases por outras enzimas lisossômicas. Na maioria das DLDs, mais do que um componente é acumulado, por exemplo, na MPS II, onde o principal material armazenado é o sulfato de heparan e o sulfato de dermatan, mas outros substratos como gangliosídeo GM2 e GM3 e a subunidade c do ATP sintase mitocondrial também são acumulados no cérebro [6]. Os novos conceitos em biologia celular levaram a propor uma nova classificação das DLDs por Platt FM e Walkley, 2004 [2] (Quadro 1).

Cerca de mais de 600 doenças ligadas ao cromossomo X foram descritas até o momento, e somente três delas são DLDs: doença de Fabry (MIM 301500), MPSII (MIM 30900) e doença de Danon (MIM 300257). Esta revisão será focada nas duas condições mais frequentes: doença de Fabry e MPS II (Síndrome de Hunter).

Doença de Fabry

Doença de Fabry é uma condição ligada ao cromossomo X, sendo um raro erro inato do catabolismo lisossômico dos glicoesfingolipídeos, resultado de uma atividade deficiente da hidrolase lisossômica α -galactosidase A (α -GAL; EC 3.2.1.22). A incidência estimada desta doença é de 1:40,000-117,000 nascidos vivos do sexo masculino [4,7,8]. Estes valores podem estar subestimados, uma vez que a triagem neonatal realizada em recém nascidos do sexo masculino em uma região do nordeste da Itália mostrou uma

incidência de 1:4,000 [9]. O gene da α -galactosidase A (*GLA* 300644) está localizado em Xq22.1 e se espande em 12kb do DNA compreendendo um total de 7 exons [8]. Mais de 400 mutações no gene *GLA* foram descritas em pacientes com doença de Fabry, sendo a maioria delas mutações privadas [10,11]. A deficiência enzimática leva ao acúmulo progressivo de globotriosilesfingosina (Gb3) e globotriosilesfingosina desacetilada (liso-Gb3).

Ela é uma doença multissistêmica que afeta o endotélio vascular, glomérulo e túbulos renais, gânglios dorsais, miócitos cardíacos, tecido conectivo e válvulas, córnea e pele. Os principais sinais e sintomas são: angioqueratomas, perda progressiva da função renal, proteinúria, acroparestesia das mãos e pés, hipertrofia cardíaca e anomalias de condução, eventos isquêmicos, distrofia corneal, hipohidrose e dificuldade de regulação da temperatura [8,11-13]. A Figura 1 apresenta, respectivamente, o filho hemizigoto com doença de Fabry e sua mãe heterozigota também clinicamente afetada.

A prevalência de mulheres portadoras de mutação para doença de Fabry é estimada em 1:339,000 no Reino Unido [14]. Mulheres heterozigotas são comumente descritas como assintomáticas ou com sintomas leves e intermitentes [7]. Os sinais e sintomas mais comuns da doença de Fabry são apresentados na Quadro 2 [8,14,15-19]. Deegan *et al.*, 2006 [16] descreveram que 70% das mulheres heterozigotas podem apresentar sinais e/ou sintomas da doença. A doença em mulheres pode ser tão grave quanto em homens [7,20,21]; entretanto, uma taxa de progressão mais lenta e uma alta variabilidade fenotípica é mais comum [14,22]. A expectativa de vida é reduzida em cerca de 20 anos nas mulheres heterozigotas [23].

A medida da atividade da α -GAL nem sempre permite a identificação de heterozigotas [8,23], e acredita-se não haver correlação entre a atividade da α -GAL em plasma ou leucócitos, genótipo e a gravidade clínica apresentada por heterozigotas [2]. Entretanto, alguns autores declaram que mulheres com doença clássica de Fabry geralmente tem baixa atividade da α -GAL e aumento do nível urinário de Gb3 [24]. Em mulheres com suspeita de apresentar doença de Fabry devido à sintomatologia ou achados de biópsia tissular, mas com história familiar negativa, a análise do DNA é frequentemente solicitada para um diagnóstico [15,25]. Por outro lado, Wilcox *et al.*, 2008 [18] mostraram que a

atividade da α -GAL em leucócitos pode levar ao diagnóstico em 88% das mulheres, sugerindo que este teste possa ser usado em conjunto com a medida de Gb3 urinário [26] e que dessa forma poderia ser um caminho eficiente para a triagem de mulheres em risco de serem heterozigotas.

Mucopolissacaridose tipo II

A incidência da MPS II é estimada entre 1:110.000 e 132.500 nascidos vivos [27,28]. MPS II é um erro inato de herança ligada ao cromossomo X, resultado da deficiência da enzima lisossômica iduronato-2-sulfatase (IDS; EC 3.1.6.13). A função deficiente da IDS leva ao depósito de glicosaminoglicanos (GAGs) em vários órgãos e tecidos. Os GAGs parcialmente degradados são o sulfato de heparan e o sulfato de dermatan, os quais apresentam-se em concentrações aumentadas na urina dos pacientes com MPS II. O gene da *IDS* foi mapeado no cromossomo Xq28 e contém 9 exons os quais se expandem em 24kb [29,30]. Mais de 300 mutações já foram descritas [10]. Existe também um pseudogene localizado 20kb do gene ativo [31].

Esta é uma doença multissistêmica, a qual inclui as seguintes manifestações principais: face grosseira, baixa estatura, hepatoesplenomegalia, disostose múltipla, contraturas articulares, doença pulmonar obstrutiva, surdez, hidrocefalia, infecções pulmonares recorrentes, doença valvular cardíaca e, em alguns pacientes, retardo mental [32]. A doença é classificada como leve ou grave de acordo com a ausência ou presença de retardo mental [33,34]. A doença é crônica, progressiva e, nos casos graves, a morte pode acontecer antes dos 15 anos. Doença cardíaca e pulmonar são as causas de morte mais comuns [32]. A Figura 2 apresenta um filho com MPS II e sua mãe heterozigota não afetada clinicamente.

Na MPS II, a doença clínica em mulheres é muito rara e a maioria dos casos relatados na literatura apresenta o fenótipo grave [35-43] (Quadro 3). Pelo menos dez casos femininos já foram descritos [43].

A identificação de mulheres heterozigotas para MPS II somente através da medida da atividade da IDS não é confiável em muitos casos [37,44,45]. É sugerido que quanto menor o valor da IDS, maior a possibilidade de mulher ser heterozigota para MPS II [46]. Infelizmente a medida de GAGs na urina também não auxilia na identificação de portadoras [51]. O único modo de alcançar o diagnóstico definitivo é através da análise molecular [47].

HERANÇA LIGADA AO CROMOSSOMO X

A herança ligada ao cromossomo X foi primeiramente descrita por Morgan [48,49] e uma das primeiras doenças reconhecidas como tendo este padrão de herança foi o daltonismo [48]. Classicamente uma doença ligada ao cromossomo X apresenta uma transmissão vertical na qual as heterozigotas transmitem o alelo para seus filhos e filhas; filhas de homens afetados são sempre heterozigotas e filhos de homens afetados são sempre normais. Tradicionalmente, as doenças ligadas ao cromossomo X são classificadas como tendo uma herança recessiva ou dominante. A transmissão vertical através de heterozigotas assintomáticas para o seu filho afetado é conhecida como herança ligada ao cromossomo X recessiva. Por outro lado, a herança ligada ao X dominante é reconhecida como a transmissão vertical por filhas sintomáticas de homens afetados, as quais transmitem para ambos seus filhos e filhas [48,11].

É verdade que para a vasta maioria de mutações de genes ligados ao cromossomo X implicará doença somente em homens [50]. Entretanto, muitas das doenças ligadas ao cromossomo X apresentam taxas de penetrância e expressividade diferentes em ambos sexos. As seguintes situações podem ser observadas: 1) para algumas condições, como doença de Fabry, heterozigotas usualmente são afetadas, mas tendem a ter um fenótipo mais leve e variável do que os hemizigotos; 2) para outras doenças, como MPS II, a penetrância em heterozigotas é muito baixa e, conseqüentemente, muito poucas heterozigotas são afetadas; 3) por outro lado, no raquitismo resistente à vitamina D, tanto a penetrância quanto gravidade são altas em ambos sexos; 4) finalmente, como por exemplo, na síndrome de Rett, a penetrância é alta em ambos sexos, mas os meninos comumente

morrem muito precocemente (intra-útero) e somente as meninas são afetadas ao nascimento [21,48,51].

Classificação das doenças ligadas ao cromossomo X

De acordo com Dobyns *et al.*, 2004 [48], a classificação tradicional das doenças ligadas ao cromossomo X (dominante ou recessiva) não deve ser aplicada para humanos. Os autores estabeleceram essa afirmação devido ao fato da classificação ser originalmente baseada no modelo da *Drosophila*, e alguns conceitos não podem ser aplicados em humanos, uma vez que há diferenças na determinação do sexo e na compensação de dose dos genes localizados no cromossomo X entre essas duas espécies (Tabela 4). O mecanismo que é responsável pela compensação de dose na *Drosophila* é baseado na velocidade de transcrição do cromossomo X, o qual é mais alta no sexo masculino, e não na inativação do cromossomo X. Entretanto, a *Drosophila* do sexo feminino que é heterozigota para uma mutação nula num gene ligado ao cromossomo X não irá apresentar mosaïcismo celular como se poderia esperar nas células femininas humanas. Baseado na revisão da literatura Dobyns *et al.*, 2004 [48] os autores classificaram 32 doenças ligadas ao cromossomo X de acordo com a penetrância (alta, intermediária e baixa) e com o índice de gravidade (proporção de todo indivíduo sintomático com um fenótipo classificado como grave em relação à toda portadora sintomática), ambos para homens e mulheres. A doença de Fabry foi classificada como tendo uma alta penetrância (100%) e índice de gravidade (84%) para homens; para mulheres, entretanto, a penetrância era alta (70%), ao contrário do índice de severidade (4%). Para MPS II, também foi encontrada alta penetrância (100%) e índice de gravidade (81%) no sexo masculino; o sexo feminino, entretanto, foi classificado com baixa penetrância e índice de gravidade. Devido à heterogeneidade clínica encontrada, estes autores sugerem que as doenças ligadas ao cromossomo X devam ser classificadas levando em conta outros mecanismos biológicos, como inativação do cromossomo X e mosaïcismo (Quadro 4).

GEMELARIDADE E DOENÇAS LIGADAS AO CROMOSSOMO X

Fenótipos discordantes em gêmeas monozigóticas (MZF), que eram heterozigotas para doenças ligadas ao cromossomo X, já foram relatadas para várias doenças lisossômicas, incluindo distrofia muscular de Duchene, deficiência de G6PD, hemofilia B, síndrome do X frágil, daltonismo, MPS II e doença de Fabry [39,52-58]. De forma interessante uma expressão clínica concordante em MZF heterozigotas nunca foi relatada [58].

Somente um par de gêmeas monozigóticas (MZF) com doença de Fabry e fenótipo discordante foi descrito na literatura. As pacientes apresentavam a mutação c.G10182A (exon 5). Com 26 anos, a MFZ afetada apresentava sinais e sintomas graves: proteinúria renal, angioqueratomas na região pélvica e coxas, córnea verticilata e acroparestesia nos quarto membros. O fenótipo foi atribuído à inativação randômica do cromossomo X favorecendo o alelo da *GLA* na MZF afetada, demonstrando uma direção oposta [52-54]. Gêmeas MZF com MPS II, também somente um caso foi descrito na literatura e a gêmea afetada apresentava cariótipo normal e uma inativação randômica do cromossomo X que favorecia o alelo mutante da *IDS* [39].

Tibério (1994) [58] revisou algumas características que são comuns para doenças ligadas ao cromossomo X em MZF: 1) o cariótipo é normal; 2) uma gêmea é gravemente afetada e a outra é poupada; 3) fenótipos intermediários não foram descritos; 4) o padrão de inativação do X é oposto para o desvio (o alelo anormal inativado na maioria das células da gêmea normal, e o alelo normal inativado na maioria das células da gêmea afetada; ou um desvio da inativação em uma gêmea e inativação randômica na outra gêmea); 5) a doença está mapeada entre as Xq27-28, Xp21, Xq22 e Xp22. Devido a essas observações, três hipóteses são possíveis para explicar o fenótipo discordante nestes casos: 1) agregação casual das células portadoras do mesmo cromossomo inativo que predispõe a gemelaridade [59]; 2) um efeito de amostragem ocorrendo uma divisão simétrica ou assimétrica da massa celular interna após a inativação do cromossomo X [59,60] e 3) durante o *crossing-over*, a segregação de uma cromátide com a recombinação e a outra sem, nas células filhas levam obrigatoriamente à inativação da cromátide que está sem o *crossing-over* [61]. Infelizmente parece que nenhuma dessas três hipóteses responde completamente a discordância observada entre as gêmeas MFZ para doenças ligadas ao cromossomo X [58].

A inativação do cromossomo X ocorre muito precocemente na vida embrionária, no estágio tardio de blastocisto na embriogênese [41,61], sendo que uma das possíveis explicações para variabilidade na expressão de uma doença ligada ao cromossomo X em MZF residiria no fato de que o processo de inativação precederia o evento da generalidade [54,55,59,62-64]. Também foi observado que em gêmeas MZF dicoriônicas, a gemelaridade ocorre antes ou ao redor da inativação do cromossomo X e, em gêmeas monocoriônicas, a gemelaridade ocorre após [65]. Então, deveria ser esperado que o fenótipo discordante fosse mais freqüente em gêmeas dicoriônicas; entretanto, poucos casos de doenças ligadas ao cromossomo X discordantes em gêmeas dicoriônicas já foram relatadas [39,56]. Uma nova explicação proposta por Monteiro *et al.*, 1998 [63] é que gêmeas monocoriônicas MZF são, de fato, um grupo heterogêneo que difere no momento do evento de gemelaridade, após o início da inativação do cromossomo X [57].

Existem várias outras explicações possíveis para os fenótipos discordantes entre gêmeas monozigóticas: causas ambientais, vários mecanismos embriológicos, anormalidades vasculares, defeitos nas estruturas de linha media e mudanças pós-zigóticas no material genético, incluindo mutações somáticas [60].

INATIVAÇÃO DO CROMOSSOMO X, DOENÇA DE FABRY E MPS II

A principal questão a ser respondida é se o desvio da inativação do cromossomo X é o principal mecanismo responsável por diferentes taxas de penetrância e expressividade apresentada nas heterozigotas para as doenças de Fabry e MPS II (Tabela 5).

Processo de inativação do X

A inativação do cromossomo X foi primeiramente descrita por Lyon [66,67] que sugeriu que a inativação do cromossomo X era baseada no padrão em mosaico de camundongos de fêmeas heterozigotas. Lyon [66,67] propôs as regras gerais para inativação do cromossomo X: 1) fêmeas normais têm somente um cromossomo X ativo; 2) a inativação do X ocorre precocemente no desenvolvimento; 3) o cromossomo X inativo pode ser materno ou paterno e a escolha é randômica; 4) a inativação do cromossomo X é

irreversível em células somáticas e através de todos os descendentes. Porque fêmeas têm dois cromossomos X e machos somente um, a inativação do cromossomo X estabelece um mecanismo chamado de “compensação de dose”, como resultado, as fêmeas são mosaicos [21].

O processo de inativação do X é dependente de muitos fatores e é tecido-específico [50]. Ele é iniciado no centro de inativação do cromossomo X (*Xic*) localizado em Xq13.2 [68]. O gene específico da transcrição da inativação (*Xist*; MIM 314670) é o responsável pelo processo de inativação em *cis* [69] e ele é transcrito somente no cromossomo X inativo. Em *Xic*, é também transcrito, numa orientação anti-sentido, o gene específico da transcrição inativação anti-sentido (*Tsix*; MIM 300181) que tem a função de regular a expressão precoce e a escolha de qual cromossomo será inativado [70]. Quando o processo de inativação é estabelecido, todas as células descendentes apresentarão o mesmo padrão. A inativação do cromossomo X em células somáticas é muito estável [71], permanente e irreversível, exceto na oogênese e na espermatogênese [72]. Os principais passos da inativação são: contagem, escolha e iniciação [73]. O primeiro passo é manter um dos cromossomos X ativo [21] e isto é atribuído à existência de um fator limitante autossômico [71]. Muitas modificações epigenéticas são necessárias para garantir a manutenção e a herdabilidade da inativação do cromossomo X [74]. Entretanto, nem todos os genes presentes no cromossomo X são inativos e cerca de 25% dos genes escapam da inativação e a maioria deles estão localizados no braço curto desse cromossomo [75].

A Lionização segue a distribuição gaussiana na população feminina e é esperado que mulheres sejam 50:50 para genes que sofreram a inativação do cromossomo X, mas proporções 60:40 ou 70:30 são as mais comuns [76] e mesmo 80:20 ou 90:10 podem ser consideradas normais [50,65]. Entretanto, pelo menos 5-10% das mulheres normais apresentam um desvio extremo da inativação do cromossomo X [77], enquanto alguns estudos mostram uma variação entre 4% a 33% [78]. Um desvio extremo da inativação do cromossomo X é definido como afetando mais de 90% de um alelo [79] e pode ser a consequência de: 1) viés na escolha de qual cromossomo X será inativado; 2) rearranjos ou mutação no cromossomo X os quais afetam a viabilidade de células com as quais uma ou

outra ativa o X; ou 3) fatores estocásticos [71,76]. O desvio aumentado da inativação do cromossomo X, definido como mais de 80:20, é considerado como patogênico [80].

Estudos nas células periféricas do sangue mostram que o desvio da inativação do cromossomo X aumenta com a idade, mas o significado prático deste achado é incerto. Entretanto, é possível que o desvio em idades avançadas seja correlacionado com a presença de um alelo patogênico no cromossomo X [76]. O processo “desvio com a idade” pode ser causado pela perda estocástica clonal de células hematopoéticas [81] ou vantagem competitiva para células tronco-hematopoéticas com um genótipo específico de genes ligados ao cromossomo X [82].

Desvio da inativação do X e patologias

Tradicionalmente, os principais mecanismos conhecidos por influenciar a expressividade de doenças ligadas ao cromossomo X são: desvio da inativação [43,67,83,84], expansão clonal e mosaicismo somático [85]. Entretanto, mulheres heterozigotas para doenças ligadas ao cromossomo X podem manifestar sinais e sintomas se: 1) a mutação confere uma vantagem proliferativa para a célula mutante; 2) a mutação está no cromossomo X ativo; [36,43,85]; 3) monossomia completa do X está presente; 4) dissomia uniparental para o cromossomo X mutante está presente; [39]; 5) a mutação é localizada no gene *XIST* [65] ou 6) não existe correção cruzada entre as células que apresentam atividade enzimática normal ou deficiente [21].

Como mencionado anteriormente, o desvio da inativação do cromossomo X tem sido considerado como responsável pelas manifestações clínicas em mulheres portadoras de doenças ligadas ao cromossomo X, como por exemplo, na distrofia muscular de Duchenne ou na hemofilia A [55]. O desvio da inativação do cromossomo X também parece estar envolvido em outras situações como: abortamento de repetição [86,87] e câncer de mama [88]. O desvio da inativação pode ser primário ou secundário. Primário como resultado do desvio por si mesmo, por exemplo, uma mutação no gene *XIST*; ou secundário se a inativação não randômica apresentar como consequência a seleção celular [22,89].

É possível identificar quatro padrões de inativação do cromossomo X em heterozigotas para doenças ligadas ao cromossomo X: 1) inativação randômica é

comumente associada a um fenótipo normal; 2) inativação randômica leva a manifestações em um espectro contínuo e um fenótipo normal requer o desvio da inativação favorecendo a expressão do alelo normal no tecido; 3) desvio extremo nas células mutadas leva á morte celular ou ao não desenvolvimento ou ainda à uma falha de migração ou 4) desvio gradual por causa da seleção celular devido à vantagem proliferativa do tipo selvagem (ou mutante) das células expressas no tecido [21].

A inativação não balanceada do cromossomo X pode ocorrer como uma variação estocástica ou devido a fatores genéticos influenciando a própria inativação do cromossomo X ou devido ao mecanismo de seleção pós-inativação [22]. As duas primeiras são raras e ocorrem independentemente do tipo de mutação no gene da doença [22,65].

POSSÍVES EXPLICAÇÕES PARA O FENÓTIPO

Doença de Fabry

Heterozigotas para doença de Fabry podem ser sintomáticas em 60-70% [22,90]. Algumas vezes os sintomas são tão graves quanto em homens [7,90]. Tem sido sugerido que estudos da inativação do cromossomo X podem ajudar a prever o fenótipo em mulheres com doença de Fabry [11,22]. Para alguns autores [8,15,23] o desvio da inativação do cromossomo X desempenha um papel essencial na expressão do fenótipo de heterozigotas para doença de Fabry. Dobrovolny *et al.*, 2005 [13] descreveram que algumas mulheres com inativação preferencial do cromossomo X tem uma progressão da doença mais rápida e sugere que a inativação é o principal fator para determinar a gravidade do envolvimento clínico e a morbidade em heterozigotas para doença de Fabry.

Entretanto, para outros autores [51], nem o fenótipo e nem a gravidade estão associadas ao desvio da inativação. Eles concluem que a inativação do cromossomo X em leucócitos de mulheres com doença de Fabry não é útil para prever o prognóstico e não deve ser utilizada para determinar as opções terapêuticas. A progressão da doença foi relacionada com a não correção enzimática e a diminuição da sua eficiência no decorrer dos

anos, o que poderia explicar o fato das mulheres heterozigotas serem mais sintomáticas com o passar do tempo [22].

O mecanismo de correção enzimática é também chamado de cooperação metabólica. As enzimas lisossômicas entram e saem dos lisossomos livremente e são transferidas entre as células mediadas pela endocitose através do receptor de manose-6-fosfato. Quando a enzima é deficiente, o produto não digerido acumula nos lisossomos [85]. Na doença de Fabry, a quantidade da enzima ativa secretada sendo insuficiente ou se, a enzima secretada não é adequadamente aproveitada pelas células normais não irá permitir que a correção cruzada ocorra adequadamente [16,21,85]. A última observação é sugerida pelo fato de que a atividade enzimática no plasma ou leucócitos pode não refletir a situação interna nos lisossomos dos tipos celulares relevantes para doença de Fabry, o que sugere que a absorção de células normais pode ser deficiente [12,16]. Parece que o padrão distinto de recaptção dos receptores da manose-6-fosfato e a localização na enzima pode ser responsável pela baixa absorção da enzima e conseqüentemente algumas mulheres irão manifestar a doença [85]. Outra hipótese é relacionada a um novo conceito (“indução cruzada”): níveis aumentados no plasma de liso-Gb3 (uma forma desacetilada de Gb3) foram encontradas em heterozigotas sintomáticas para doença de Fabry e parecem ser positivamente associados com a gravidade do quadro clínico [91]. Se isto é verdade, talvez liso-Gb3 é amplamente difundível, e tem a capacidade de inibir a atividade da α -GAL produzida por células as quais são ativas no cromossomo X não mutado, portanto levando à sintomatologia clínica na maioria das heterozigotas.

Outros fatores afetam a expressão na doença de Fabry: 1) a natureza da mutação – e a correlação com a atividade enzimática [15] e 2) o grupo sanguíneo – pacientes com os grupos sanguíneos B e AB são mais gravemente afetados do que indivíduos de outros grupos, provavelmente porque esses pacientes acumulam, juntamente com a globotriaosilceramina e galabiosilceramida, dois outros glicosfingolipídeos[15].

MPS II

Diferentemente das heterozigotas para doença de Fabry, mulheres heterozigotas para MPS II são poupadas da doença. Mas por quê? Isto pode ser atribuído à correção

cruzada, das células nas quais o cromossomo X ativo é aquele com a mutação, pela enzima funcional secretada pelas células nas quais o gene não mutante é ativo [92]. Schwartz *et al.*, 2008 [93] sugeriram que em algumas células de heterozigotas para MPS II, como condrócitos ou hepatócitos, o cromossomo X portador do alelo mutante poderia ser preferencialmente inativado ou poderia reduzir a viabilidade celular. Conseqüentemente, mulheres heterozigotas para MPS II são raramente afetadas a menos que um defeito genético coincidente aconteça, como uma translocação do cromossomo X ou a presença simultânea de dois alelos mutados. De fato, na MPS II a explicação mais aceita é a de que o desvio da inativação do cromossomo X seja responsável pelo fenótipo clínico e bioquímico apresentado por pacientes do sexo feminino gravemente afetadas [32], mas não há dados suficientes na literatura para confirmar esta hipótese.

CONCLUSÕES

A maioria das mulheres são mosaicos, tendo uma mistura de células expressando tanto seus genes maternos e paternos ligados ao cromossomo X. Frequentemente, o mosaicismo celular é vantajoso, melhorado o efeito deletério das mutações ligadas ao cromossomo X e contribuindo para a diversidade fisiológica. Embora, algumas vezes o mosaicismo traga uma vantagem biológica significativa, o desfecho nunca é certo [85].

É interessante, que apesar da doença de Fabry e da MPS II serem ambas doenças lisossômicas ligadas ao cromossomo X, elas mostram muitas diferenças na expressividade clínica das mulheres heterozigotas. As principais diferenças, no momento, podem ser explicadas por: 1) o mecanismo de correção cruzada e de indução cruzada; 2) o desvio da inativação do cromossomo X [21].

Como proposto por Dobyns *et al.*, 2004 [48], as doenças ligadas ao cromossomo X mostram um contínuo em penetrância e novas regras devem ser estabelecidas para explicar os vários fenótipos observados. Apesar do fato de terem decorrido mais de 30 anos desde a descoberta da existência do mecanismo de inativação do cromossomo X, nós ainda temos muito a aprender, e novas informações sobre biologia celular ainda são necessárias para permitir prover um aconselhamento genético mais preciso para as famílias afetadas.

Conflito de interesses

Os autores declaram não ter conflitos de interesse.

Contribuição dos autores

Todos os autores contribuíram para este artigo de revisão. Os autores leram e aprovaram a versão final do artigo.

Agradecimentos

Os autores deste trabalho agradecem a bolsa de estudos provida pela CAPE através do Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente/UFRGS (LLP), ao CNPq (RG e IVS) e ao FIPE pelo suporte.

REFERÊNCIAS

1. Wraith JE: **Lysosomal disorders.** *Semin Neonatol* 2002, **7**:75-83.
2. Platt FM, Walkley SU: *Lysosomal Disorders of the Brain.* Great Britain: Oxford University Press; 2004.
3. Meikle PJ, Hopwood JJ: **Lysosomal storage disorders: emerging therapeutic options require early diagnosis.** *Eur J Pediatr* 2003, **162** (Suppl 1):S34-37.
4. Meikle PJ, Hopwood JJ, Clague AE, Carey WF: **Prevalence of lysosomal disorders.** *JAMA* 1999, **281**:249-254.
5. Wraith JE: **Advances in the treatment of lysosomal storage disease.** *Dev Med Child Neurol* 2001, **43**:639-646.
6. Ballabio A, Gieselmann V: **Lysosomal disorders: from storage to cellular damage.** *Biochim Biophys Acta* 2009, **1793**:684-696.
7. Gibas AL, Klatt R, Johson J, Clarke JTR, Katz J: **Disease rarity carrier status and gender: a triple disadvantage for women with Fabry disease.** *J Genet Couns* 2008, **17**:528-537.
8. Desnick RJ, Ioannou YA, Eng CM: **α galactosidase A deficiency: Fabry disease.** In the metabolic and molecular basis of inherited disease. Volume III. 8th edition. Edited by Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D. New York: MacGraw-Hill; 2001:3773-3774.
9. Spada M, Pagliardini S, Yasuda M, Tukel T, Thiagarajan G, Sakuraba H, Ponzzone A, Desnick RJ: **High incidence of later-onset Fabry disease revealed by newborn screening.** *Am J Hum Genet* 2006, **79**:31-40.
10. The Human Gene Mutation Database at the Institute of Medical Genetics in Cardiff [<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>]
11. Dobrovolny R, Dvorakova L, Ledvina J, Magagge S, Bultas J, Lubanda JC, Elleder M, Karetova D, Pavlikova M, Hrebicek M: **Relationship between X inactivation and clinical involvement in Fabry heterozygotes. Eleven novel mutations in the α -galactosidase A gene in the Czech and Slovak population.** *J Mol Med* 2005, **83**:647-654.
12. Atul Mehta, Michael Beck, Gere Sunder-Plasmann: *Fabry disease perspectives from 5 years of FOS.* United Kingdom: OXFORD Pharmagenesis; 2006.
13. MacDermot KD, Holmes A, Miners AH: **Natural history of Fabry disease in affected males and obligate carrier females.** *J Inherited Metab Dis* 2001, **24**(Suppl 2):13-14.
14. MacDermot KD, Holmes A, Miners AH: **Anderson-Fabry disease: clinical manifestations and impact of disease in a cohort of 60 obligate Carrier females.** *J Med Genet* 2001, **38**:769-775.

15. Whybra C, Kapmann C, Willers I, Davies J, Winchester B, Kriegsmann J, Bruhl K, Gal A, Bunge S, Beck M: **Anderson-Fabry disease: clinical manifestations of the disease in female heterozygotes.** *J Inherit Metab Dis* 2001, **24**:715-724.
16. Deegan PB, Bahner F, Barba Romero MA, Hughes DA, Kapmann C, Beck M and on behalf of European FOS Investigators: **Natural history of Fabry disease in females in the Fabry Outcome Survey.** *J Med Genet* 2005, **43**:347-352.
17. Nagasaki A, Nishie W, Sato K, Oba I, Noguchi E, Akitsu H, Sawamura D, Shimizu H: **Clinical and genetic analysis of Fabry disease: report of six cases including three heterozygotes females.** *J Dermatol Sci* 2008, **52**:61-64.
18. Wilcox WR, Oliveira JP, Hopkin RJ, Ortiz A, Banikazemi M, Feldt-Rasmussen U, Sims K, Waldek S, Pastores GM, Lee P, Eng CM, Marodi L, Standford KE, Breunig F, Wanner C, Warnock DG, Lemay RM, Germain DP: **Females with Fabry disease frequently have a major organ involvement: lessons from the Fabry Registry.** *Mol Genet Metab* 2008, **93**:112-12.
19. Kobayashi M, Ohashi T, Sakuma M, Ida H, Eto Y: **Clinical manifestations and natural history of Japanese heterozygous females with Fabry disease.** *J Inherited Metab Dis* 2008, in press.
20. Baehner F, Kapmann C, Whybra C, Miebach E, Wiethoff CM, Beck M: **Enzyme replacement therapy in heterozygous females with Fabry disease: results of a phase IIB study.** *J Inherited Metab Dis* 2003, **26**:617-27.
21. Migeon BR: *Females are Mosaics: X inactivation and sex differences in disease.* New York: Oxford University Press; 2007.
22. Maier EM, Osterrieder S, Whybra C, Ries M, Gal A, Beck M, Roscher AA, Muntau AC: **Disease manifestations and X inactivation in heterozygous females with Fabry disease.** *Acta Paediatr* 2006, **95**(Suppl):30-38.
23. Mehta A, Ricci R, Widmer U, Dehout F, Garcia de Lorenzo A, Kapmann C, Linhart A, Sunder-Plasmann G, Ries M, Beck M: **Fabry disease defined: baseline clinical manifestations of 366 patients in the Fabry Outcome Survey.** *Eur J Clin Invest* 2004, **34**:236-342.
24. Kitagawa T, Suzuki K, Ishige N, Ohsahi T, Kobayashi M, Eto Y, Tanaka A, Odaka H, Owada M: **Non-invasive high-risk screening for Fabry disease hemizigotes and heterozigotes.** *Pediatr Nephrol* 2008, **23**:1461-1471.
25. Linthorst GE, Poorthuis BJ, Hollak CE: **Enzyme activity for determination of presence of Fabry disease in women results in 40% false-negative results.** *J Am Coll Cardiol* 2008, **51**: 2082-2083.
26. Kitagawa T, Ishige N, Suzuki K, Owada M, Ohsahi T, Kobayashi M, Eto Y, Tanaka A, Mills K, Winchester B, Keutzer J: **Non-invasive screening method for Fabry disease by measuring globotriacylceramide in whole urine samples using tandem mass spectrometry.** *Mol Genet Metab* 2005, **85**:196-202.

27. Machili G, Barbujani G, Danieli GA, Hermann FH: **Segregation and sporadic cases in families with Hunter's syndrome.** *J Med Genet* 1991, **28**: 398-401.
28. Nelson J, Crowhust J, Carey B, Greed L: **Incidence of the mucopolysaccharidosis in Western Australia.** *Am J Med Genet* 2003, **123A**:310-313.
29. Wilson PJ, Meaney CA, Hopwood JJ, Morris CP: **Sequence of the human iduronate 2-sulfatase (IDS) gene.** *Genomics* 1993, **17**:773-775.
30. Flomen RH, Green EP, Green PM, Bentley DR, Giannelli F: **Determination of the organization of coding sequences within the iduronate sulphate (IDS) gene.** *Hum Mol Genet* 1993, **2**:5-10.
31. Timms Km, Lu F, Shen Y, Pierson CA, Muzny DM, Nelson DL, Gibbs RA: **130 kb of DNA sequence reveals two new genes and a regional duplication distal to the human iduronate-2-sulfaatse locus.** *Genome Res* 1995, **5**:71-78.
32. Neufeld EF, Muenzer J: **The Mucopolysaccharidoses.** In *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease*. Volume III. 8th edition. Edited by Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D. New York: MacGraw-Hill; 2001:3421-3452.
33. Young ID, Harper PS, Archer IM, Newcombe RG: **A clinical and genetic study of Hunter's syndrome 1. Heterogeneity.** *J Med Genet* 1982, **19**:401-407.
34. Young ID, Harper PS, Archer IM, Newcombe RG: **A clinical and genetic study of Hunter's syndrome 2. Differences between the mild and severe forms.** *J Med Genet* 1982, **19**:408-411.
35. Neufeld EF, Liebaers I, Epstein CJ, Yatziv S, Milunsky A, Migeon BR: **The Hunter syndrome in females: is there na autosomal recessive form of iduronate sulfatase deficiency?** *Am J Hum Genet* 1977, **29**:455-456.
36. Mosmann J, Blunt S, Stephens R, Jones EE, Pembrey M: **Hunter's disease in a girl: association with X:5 chromosomal translocation disrupting the Hunter gene.** *Arch Dis Child* 1983, **58**:911-915.
37. Broadhead DM, Kirk JM, Burt AJ, Gupta V, Ellis PM, Besley GT: **Full expression of Hunter's disease in a female with an X-chromosome deletion leading to non-random inactivation.** *Clin Genet* 1986, **20**:392-398.
38. Clarke JT, Greer WL, Strasberg PM, Pearce RD, Skomorowski MA, Ray PN: **Hunter disease (mucopolysaccharidosis type II) associated with unbalanced inactivation of X chromosomes in a karyotypically normal girl.** *Am J Hum Genet* 1991, **49**:289-297.
39. Winchester B, Young E, Geddes S, Genet S, Hurst J, Middleton-Price H, Williams N, Webb M, Habel A, Malcom S: **Female twin Hunter disease due to nonrandom inactivation of the X-chromosome: a consequence of twinning.** *Am J Med Genet* 1992, **1**:44:834-838.

40. Sukegawa K, Song XQ, Masuno M, Fukao T, Shimosawa N, Fukuda S, Isogai K, Nishio H, Matsuo M, Tomatsu S, Kondo N, Orii T: **Hunter disease in a girl caused by R468Q mutation in the iduronate-2-sulfatase gene and skewed inactivation of the X chromosome carrying the normal allele.** *Hum Mut* 1997, **10**:316-317.
41. Sukegawa K, Matsuzaki T, Fukuda S, Masuno M, Fukao T, Kokutyu M, Iwata S, Tomatsu S, Orii T, Kondo N: **Brother/sister sibilings affected with Hunter disease: evidence for skewed X chromosome inactivation.** *Clin Genet* 1998, **53**:96-101.
42. Cudry S, Tigaud I, Frossairt R, Bonnet V, Maire I, Bozon D: **MPS II in females: molecular basis of two different cases.** *J Med Genet* 2000, **37**:E29.
43. Tuschl K, Gal A, Paschke E, Kircher S e Bodamer OA: **Mucopolysaccharidosis type II in females case report and review of literature.** *Pediatr Neurol* 2005, **32**:270-272.
44. Zlogotora J, Bach G: **Heterozygote detection in Hunter syndrome.** *Am J Med Genet* 1986, **17**:661-665.
45. Adinolfi M: **Hunter syndrome: cloning of the gene, mutations and carriers detection** *Dev Med Neurol* 1993, **35**:79-85.
46. Schwartz IVD: **Estudo clínico, bioquímico e genético de pacientes com mucopolissacaridoses II e de possíveis heterozigotas.** *PhD tesis.* Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Departamento de Genética e Biologia Molecular; 2004.
47. Wraith JE, Scarpa M, Beck M, Bodamer AO, De Meileir L, Guffon N, Meldgaard Lund A, Malm G, Van der Ploeg AT, Zeman J: **Mucopolysaccharidosis type II (Hunter syndrome): a clinical review and recommendations for treatment in the era of enzyme replacement therapy.** *Eur J Pediatr* 2008, **167**:267-277.
48. Dobyns WB, Filauro A, Tomson BN, Chan AS, Ho AW, Ting NT, Osterwijk JC, Ober C: **Inheritance of most X-linked traits is not dominant or recessive, just X-linked.** *Am J Med Genet* 2004, **129A**:136-143.
49. Morgan TH (Ed): Croonian Lecture- On the mechanism of heredity. *Proceeding of the Royal Society*; 1st June 1922, New York 94:162-197
50. Willard 2000 HF: **The sex chromosomes and X chromosome inactivation.** In the metabolic and molecular basis of inherited disease. Volume III. 8th edition. Edited by Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D. New York: MacGraw-Hill:1191-1211
51. Chabas A, Happle R: **Understanding the biology of X linked diseases.** *Acta Paediatr* 2006, **451** (Suppl) **95**:9-10.
52. Redonnet-Vernhet I, Ploss van Amstel JK, Jansen RPM, Wevers RS, Salvayre R, Levade T J: **Uneven X inactivation in a female monozygotic twin pair with Fabry disease and discordant expression of a novel mutation in the alpha-galatosidase A gene.** *J Med Genet* 1996, **33**:682-688.

53. Levade T, Giordano F, Maret A, Margery MC, Bazex J, Salvayre R: **Different phenotypic expression of Fabry disease in female monozygotic twins.** *J Inherited Metab Dis* 1991, **14**:105-16.
54. Marguery MC, Giordano F, Parant M, Samalens G, Levade T, Salvayre R, Maret A, Clavas P, Bourrouillou G, Cantala P, Bazex J: **Fabry's Disease: Heterozygous form of different expression in two monozygous twin sisters.** *Dermatology* 2003, **187**:9-15.
55. Richards CS, Watkins SC, Hoffman EP, Schneider NR, Mildark IW, Katz KS, Cook JD, Kunkel LM, Cortada JM: **Skewed X inactivation in a female MZ twin results in Duchene muscular dystrophy.** *Am J Hum Genet* 1990, **46**:672-681.
56. Lupski JR, Garcia CA, Zoghbi HY, Hoffamn EP, Fenwick RG: **Discordance of muscular dystrophy in monozygotic females twins:evidence supporting asymmetric splitting of the inner cell mass in a manifesting carrier of Duchene Dystrophy.** *Am J Hum Genet* 1991, **40**:354-364.
57. Valleix S, Vinciguerra C, Lavergne JM, Leuer M, Delphec M, Negrier C: **Skewed X-chromosome inactivation in monochorionic diamniotic twin sisters results in severe and mild hemophilia A.** *Blood* 2002, **100**:3034-3036.
58. Tiberio G: **MZ females twins discordant for X-linked diseases: a review.** *Acta Genet Med Gemellol* 1994, **43**:207-214.
59. Burn J, Povey S, Boyd Y, Munro EA, West L, Harper K, Thomas D: **Duchene muscular dystrophy in one of monozygotic twin girls.** *J Med Genet* 1986, **23**:494-500.
60. Nance WE: **Do twin Lyons have large spots?** *Am J Hum Genet* 1990, **46**:646-648.
61. Côté GB and Gyftodimou J: **Twinning and mitotic crossing-over: some possibilities and their implications.** *Am J Hum Genet* 1991, **47**:120-130.
62. Gardner RL, Lyon MF, Evans EP, Burtenshaw MD: **Clonal analysis of X-chromosome inactivation and the origin of the germ line in the mouse embryo.** *J Embryol Exp Morphol* 1985, **88**:349-363.
63. Monteiro J, Derom C, Vlietnick R, Kohn N, Lesser M, Gregerson PK: **Commitment to X inactivation precedes the twinning event in monochorionic MZ twins.** *Am J Hum Genet* 1998, **63**:339-346.
64. Chitnis S, Derm C, Vlietinck R, Deron R, Monterio J, Gregersn PK: **X chromosome inactivation patterns confirm the late timing of monoamniotic MZ twinning.** *Am J Hum Genet* 1999, **65**:570-571.
65. Puck JM, Willard HF: **X inactivation in females with X linked disease.** *N England J Med* 1998, **330**:325-328.
66. Lyon MF: **Gene Action in the X-chromosome of the Mouse (*Mus musculus L.*).** *Nature* 1961, **190**: 372 – 373.

67. Lyon MF: **Sex chromatin and gene action in the mammalian X-chromosome.** *Am J Hum Genet* 1962, **14**:135-148.
68. Brown CJ, Lafreniere RG, Powers VE, Sebastio G, Ballabio A, Pettigrew AL, Ledbetter DH, Levy DH, Levy E, Craig IW, Willard HF: **Localization of the X-inactivation centre on the human X chromosome in Xq13.** *Nature* 1991, **349**:82-84.
69. Willard HF: **X chromosome inactivation, XIST, and pursuit of the X inactivation center.** *Cell* 1996, **86**: 5-7.
70. Lee JT, Lu N: **Targeted mutagenesis of Tsix leads to nonrandom X inactivation.** *Cell* 1999, **99**: 47-57.
71. Brown CJ and Robinson WP: **The causes and consequences of random and non-random X chromosome inactivation in humans.** *Clin Genet* 2000, **58**:353-363.
72. Salido EC, Yen PH, Mohandas TK, Shapiro LJ: **Expression of the X-inactivation-associated gene associated XIST during spermatogenesis.** *Nat Genet* 1992, **2**:196-199.
73. Avner P, Heard E: **X-chromosome inactivation: counting, choice and initiation.** *Nat Rev Genet* 2001, **2**:59-67.
74. Heard E, Rougeulle C, Arnaud D, Avner P, Allis CD, Spector DL: **Methylation of histone H3 at Lys-9 is an early mark on the X chromosome during X inactivation.** *Cell* 2001, **107**:727-738.
75. Talebizadeh Z, Simon SD, Butler MG: **X chromosome gene expression in human tissues: male and female comparisons.** *Genomics* 2006, **88**:675-681.
76. Busque L, Mio R, Mattioli, Brais E, Blais N, Lalonde Y, Maragh M, Gilliland DG: **Non-random X inactivation patterns in normal females: lyonization ratios vary with age.** *Blood* 1996, **88**: 59-65.
77. Naumova AK, Plenge RM, Bird LM, Leppert M, Morgan K, Willard HF, Sapienza C: **Heritability of X chromosome-inactivation phenotype in a large family.** *Am J Hum Genet* 1996, **58**:1111-1119.
78. Fey MF, Liechti-Gallati S, von Rohr A, Borisch B, Theirlkas L, Schneider V, Oestreicher M, Nagel S, Ziemiecki A, Tobler A: **Clonality and X-inactivation patterns in hematopoietic cell populations detected by the highly informative M27 beta probe.** *Blood* 1994, **83**:931-938.
79. Sharp A, Robinson D, Jacobs P: **Age-and tissue specific variation of X chromosome inactivation ratio in normal women.** *Hum Genet* 2000, **107**:343-347.
80. Lyon MF: **X-chromosome inactivation and human genetic disease.** *Acta Paediatr Suppl* 2002, **91**:107-112.
81. Gale RE, Fielding AK, Harrison CN, Linch DC: **Acquired skewing of X-chromosome inactivation patterns in myeloid cells of the elderly suggests stochastic clonal loss with age.** *Br J Haematol* 1997, **98**:512-519.

82. Kristiansen M, Knudsen GP, Bathum L, Naumova AK, Sorensen TI, Brix TH, Svendsen AJ, Christensen K, Kyvik KO, Orstavik KH: **Twin study of genetic and aging effects on X chromosome inactivation.** *Eur J Hum Genet* 2005, **13**: 599-606.
83. Maier EM, Kammer S, Muntau AC, Wichers M, Braun A, Roscher AA: **Symptoms in carriers of adrenoleukodystrophy relate to skewed X inactivation.** *Ann Neurol* 2002, **52**:683-688.
84. Plenge RM, Stevenson RA, Lubs HA, Schwartz CE, Willard HF: **Skewed X-chromosome inactivation is a common feature of X-linked mental retardation disorders.** *Am J Hum Genet* 2002, **71**:168-173.
85. Migeon BR: **The role of X inactivation and cellular mosaicism in women's health and sex specific diseases.** *JAMA* 2006, **295**:22-29.
86. Uehara S, Hashiyada M, Sato K, Sato Y, Fujimori K, Okamura K: **Preferential X-chromosome inactivation in women with idiopathic recurrent pregnancy loss.** *Fertil Steril* 2001, **76**:908-914.
87. Lanasa MC, Hogge WA, Kibik C, Blancato J, Hoffman EP: **Highly skewed X-chromosome inactivation is associated with idiopathic recurrent spontaneous abortion.** *Am J Hum Genet* 1999, **65**:252-254.
88. Kristiansen M, Knudsen GP, Maguire P, Margolin S, Pedersen L, Lindblom A, Orstavik KH: **High incidence of skewed X chromosome inactivation in young patients with familial non-BRCA1/BRCA2 breast cancer.** *J Med Genet* 2005, **42**:877-880.
89. Belmont JW: **Genetic control of X inactivation and process leading to X inactivation skewing.** *Am J Hum Genet* 1996, **58**:1101-1108.
90. Wang RY, Lelis A, Mirocha J, Wilcox WR: **Heterozygotes Fabry women are not just carriers, but have a significant burden of disease and impaired quality of life.** *Genet Med* 2007, **9**:34-45.
91. Aerts JM, Groener JE, Kuiper S, Donker-Koopman WE, Strijland A, Ottenhoff R, van Roomen C, Mirzaian M, Wiljburg FA, Linthorst GE, Vedder AC, Rombach SM, Cox-Brinkmann J, Somerharju P, Boot RG, Hollak CE, Brady RO, Poorthuis BJ: **Elevated globotriaosylsphingosine is a hallmark of Fabry disease.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2008, **105**:2812-2817.
92. Braun SE, Arnovich EL, Anderson RA, Crotty PL, Mc Ivor RS, Whitley CB: **Metabolic correction and cross-correction of mucopolysaccharidosis type II (Hunter syndrome) by retroviral-mediated gene transfer and expression of human iduronate-2-sulfatase.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1993, **90**:11830-11834.
93. Schwartz IVD, Pinto LLC, Ribeiro MG, Mota JG, Acosta AX, Correia P, Horovitz D, Porciuncula CGG, Lipinski-FigueiredoE, Fett-Conte A, Oliveira Sobrinho RP, Norato DYJ, Paula AC, Kim CA, Duarte AR, Boy R, Leistner-Segal S, Burin MG, Giugliani R: **Clinical and Biochemical Studies in Mucopolysaccharidosis type II Carriers.** in press.



Figura 1. Paciente do sexo masculino com doença de Fabry (à esquerda, filho) e uma heterozigota para doença de Fabry (à direita, mãe). O paciente masculino tem 21 anos e apresenta dor e acroparestesia em mãos, intolerância à temperatura, hipohidrose e proteinúria. Ele apresenta a mutação 30delG no gene da α GAL. A mãe tem 62 anos e tem diabetes mellitus, cardiopatia e proteinúria. Ela é heterozigota para a mutação 30delG no gene da α -GAL. Imagens autorizadas pelos pacientes.

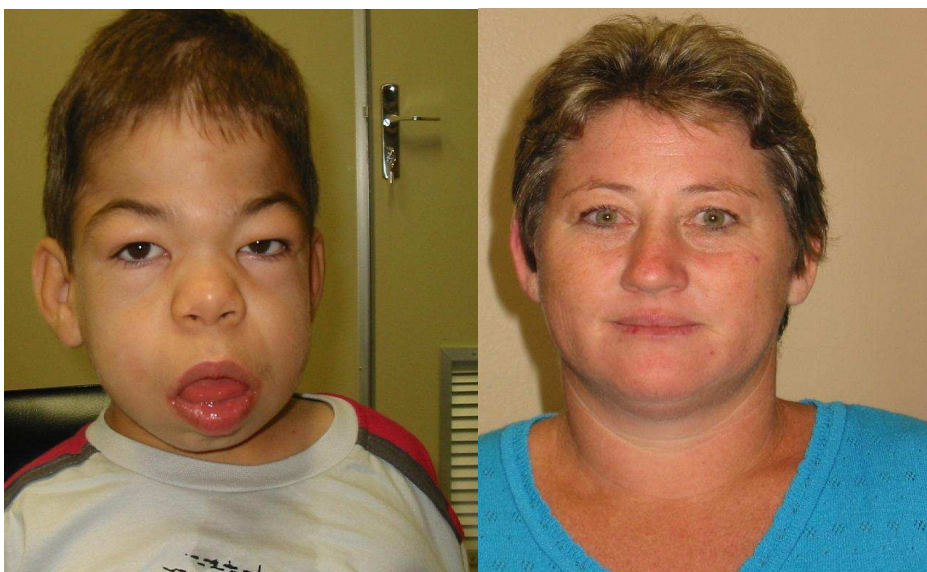


Figura 2. Paciente do sexo masculino com MPS II (à esquerda, filho) e uma heterozigota para MPS II (à direita, mãe). O paciente tem 10 anos e apresenta grave comprometimento mental, face característica, hepatoesplenomegalia, disostose múltipla, contraturas articulares, doença obstrutiva das vias aéreas, regurgitação mitral, surdez e hidrocefalia. Ele apresenta deleção total do gene da *IDS*. A mãe é heterozigota para MPS II e clinicamente assintomática. Imagens autorizadas pelos pacientes.

Quadro 1. Classificação das DLDs (adaptado de Platt e Walkley, 2004)

Defeito Molecular	Defeito Enzimático	Exemplo de doença	Número OMIM
Defeito primário de uma hidrolase lisossômica	α -Galactosidase A	Doença de Fabry	301500
	Iduronato-sulfatase	MPS II	309900
Defeito do processamento pós- tradução das enzimas lisossômicas	Fator Modificador de Sulfatases	Deficiência múltipla de sulfatases	272200
Defeito de transporte das enzimas lisossômicas	N-acetilglucosamina-1-fosfotransferase	Mucopolidose tipo II	252500
Defeito de proteção das enzimas lisossômicas	Deficiência da Proteína Protetora da Catepsina A	Galactosialidose	256540
Defeito não enzimático de proteínas lisossômicas não-solúveis	Deficiência do ativador da Hexosaminidase	GM2 tipo AB (Doença de Tay-Sachs variante AB)	272750
Defeito de proteína transmembrana	Proteína 2 de associada à membrana lisossômica	Doença de Danon	300257
Não classificado	Acúmulo intracelular de material de lipopigmentos de depósito autofluorescentes	Lipofuscinose ceróide Neuronal (CLN4)	204300

Quadro 2. Sinais e sintomas em heterozigotas para Fabry: revisão da literatura

Artigo	n	Inativação do cromossomo X	Idade (anos)	Dor neuronopática (%)	Angioqueratomas (%)	Proteinúria (%)	Anormalidades cardíacas (%)	Córnea <i>verticilata</i> (%)	Eventos isquêmicos (%)
Desnick <i>et al</i> , 2001	122	NI	1-85	<10	30	<1**	<1	70	<1
MacDermot <i>et al</i> , 2001	60	NI	>18	70	35	31.5	90	NI	6.7
Whybra <i>et al</i> , 2001	20	NI	20	90	55	55	55	70	75 †
Deegan <i>et al</i> , 2005	248	NI	38.2+/-18	77	40	35	59	40	7
Nagasaki <i>et al</i> , 2007	3	NI	43-55	100	100	66,6	NI	NI	0
Kobayashi <i>et al</i> , 2008	36	NI	4-68	50	5.6	38.9	38.9***	50*	8.3
Wilcox <i>et al</i> , 2008	1077	NI	0->50	43.3	17.8	10.6	10	12.5*	4.2

NI= não informado; *Anomalias oculares não específicas; **falência renal; ***hipertrofia ventricular esquerda; † RMI foi feita em 4/20 mulheres

Quadro 3. Pacientes do sexo feminino com MPS II

Referência	Inativação do X	Cariótipo	Mutação	Gemelaridade	Forma
Neufeld <i>et al.</i> 1977 ¹	Não testada	46,XX	Nd*	Não	Neuronopática
Mossmann <i>et al.</i> 1983	Desviada ²	46,XX t(X:5)**	Nd	Não	Neuronopática
Broadhead <i>et al.</i> 1986	Desviada ²	delXq25	Nd	Não	Neuronopática
Clarke <i>et al.</i> 1991	Desviada ²	delXq27-28	3-5cM-deletion	Não	Neuronopática
Winchester <i>et al.</i> 1992	Desviada ²	46,XX	Nd	Yes	Neuronopática ***
Sukegawa <i>et al.</i> 1997	Desviada ²	46,XX	p.R468Q/N	Não	Neuronopática
Sukegawa <i>et al.</i> 1998	Desviada ²	46,XX	p.R468L/N	Não	Neuronopática
Cudry <i>et al.</i> 2000 (case a)	Desviada ²	46,XX	p.L41P/ L41P	Não	Não neuronopática
Cudry <i>et al.</i> 2000 (case b)	Desviada ²	46,XX	[g.17419del3254+g.17418ins20]	Não	Neuronopática
Tuschl <i>et al.</i> 2004	Desviada ²	46,XX	[c.706_719del+c.705_720insG]	Não	Neuronopática

Baseado em Tuschl *et al.* 2004

Nd* não determinado;

** 46,XX t(X;5)(q27;q31)(q26;q32)

***Ela está na escola aos 11 anos, com habilidade intelectual mediana;

¹O autor reportou 2 casos que foram inicialmente diagnosticados com MPS II, mas um deles foi posteriormente diagnosticado com deficiência múltipla de sulfatases.

Dados não mostrados²

Quadro 4. Comparação entre *Drosophila* e humanos em relação ao mecanismo de compensação de dose

Características	<i>Drosophila</i>	Humanos
Fêmea	6A+XX	46, XX
Macho	6A+XY	46, XY
Fértil	6A+XX e 6A+XY	46, XX e XY
Infértil	6A+XO	45, X
Compensação de dose no cromossomo X	Taxa de transcrição do X	Inativação do X
Inativação do X	Não	Sim

*baseado em Dobyns *et al.* 2004

Tabela 5. Resumo dos mecanismos biológicos propostos por Dobyns *et al.* 2004

Tipo de produto gênico	O produto gênico causa morte celular	Fenótipo das heterozigotas	Padrão de inativação do cromossomo X	Doenças
Os produtos gênicos são células autônomas	Não	Normal Anormal	Randômico* ou desvio favorável para o alelo normal ** Randômico	Doença Fabry Distrofia muscular de Duchene
Os produtos gênicos são células não autônomas ¹ ou funcionalmente não autônomas ²	Não	Normal Anormal	Randômico Desvio favorável para o alelo anormal	MPS II

¹ Produtos gênicos não autônomos incluem as proteínas primariamente secretadas;

² Produtos gênicos funcionalmente não autônomos incluem as proteínas expressas em células não clonais, multinucleadas e pequenas moléculas que passam livremente entre as células;

* Para mulheres sem crianças afetadas no diagnóstico mas com familiares afetados;

*Para mulheres afetadas

8 ARTIGO DOS RESULTADOS

8.1 DOES MPS II HETEROZYGOTES ARE ACTUALLY ASYMPTOMATIC? A STUDY BASED ON CLINICAL AND BIOCHEMICAL DATA, X-INACTIVATION ANALYSIS AND IMAGING EVALUATIONS

(Artigo submetido em 23 de agosto de 2009 para *Molecular Genetics and Metabolism*)

Louise Lapagesse de Camargo Pinto^{1,3}, Ida Vanessa Doerdelein Schwartz^{2,3}, Sharbel Maluf³, Sandra Leistner-Segal³, Camila Zimmer da Silva³, Ana Brusius-Facchin³, Silvia Brustolin³, Maira Graef Burin³, Juan Llerena⁴, Lucia Moraes⁵, Leonardo Vedolin⁶, Alice Schuch⁶, Roberto Giugliani^{1,2,3}

Corresponding author and address:

Rua Ramiro Barcelos 2350 3º andar, Medical Genetics Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, RS, Brazil

ZIP CODE 90035-903

Phone +55 51 3359 8011

Fax + 55 51 3359 8010

email: loulapagesse@ibest.com.br

¹ Postgraduate Program in Child and Adolescent Health, UFRGS, Porto Alegre, Brazil

² Department of Genetics, UFRGS, Porto Alegre, Brazil

³ Medical Genetics Service, HCPA, Porto Alegre, Brazil

⁴ Fernandes Figueira Institute, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil

⁵ National Cancer Institute, INCA, Department of Genetics, Rio de Janeiro, Brazil

⁶ Hospital Moinhos de Vento, HMV, Department of Radiology, Porto Alegre, Brazil

ABSTRACT

Introduction: X-linked disorders are more prevalent in males, but for some of these diseases the expressivity and penetrance in females are almost similar to those ones found in males. Regarding mucopolysaccharidosis type II (MPS II), there are no studies in the literature trying to identify subtle signs and symptoms of the disease in heterozygotes.

Objective: The objective of this study was to compare heterozygotes and non-heterozygotes for MPS II in order to access the hypothesis that heterozygotes may present subtle manifestations of the disease.

Material and Methods: This observational and transversal study collected data of 40 Brazilian women with a positive familiar history for MPS II regarding clinical data, physical exam findings, karyotype, pattern of X inactivation, iduronate sulfatase (IDS) activities in leukocytes and plasma, glycosaminoglycans levels in urine, computadorized tomography (CT) scans of abdomen and spine, and brain magnetic resonance imaging.

Results: According to DNA analysis, twenty-two women were classified as heterozygotes and 18 as non-heterozygotes (median age 35 and 38.8 years, respectively). We did not find any abnormality in physical examination (n=40), karyotype (n=31/40) or spine CT scans (n=31/40). Applying the Bonferroni's correction, both groups were found to differ only in relation to IDS activities in plasma ($p<0.001$) and in leukocyte ($p<0.001$), which were lower in heterozygotes. The pattern of X-inactivation was skewed in 2 heterozygotes and in 9 non-heterozygotes.

Conclusions: We did not find any evidence of subtle clinical manifestations of MPS II in heterozygotes. Our findings suggest that there is no relation between the absence of clinical signs in these women and the occurrence of a favorable skewing pattern of X chromosome inactivation. This data supports the view of MPS II as a disease which shows a low penetrance in heterozygotes.

Keywords: X-inactivation, carrier detection, iduronate sulfatase, glycosaminoglycans, mucopolysaccharidosis type II.

INTRODUCTION

Mucopolysaccharidosis type II (MPS II; OMIM 309900) is an X-linked lysosomal disease caused by the deficient activity of iduronate-2-sulphatase (IDS; EC 3.1.6.13). The

IDS enzyme is responsible for the degradation of the glycosaminoglycans (GAGs) heparan and dermatan sulphate. In patients with MPS II, there is accumulation of these partially degraded GAGs in many organs and tissues [1]. The estimates of incidence for this disease range from 1:68.000 to 1:320.000 live-births [2-10]. It is the most frequent MPS in Taiwan and in North of Asia [11-12] and the most frequently MPS diagnosed in Brazil [13].

MPS II male patients are characterized by a chronic and progressive disease characterized by severe airway obstruction, skeletal deformities (dysostosis multiplex), hepatosplenomegaly, cardiomyopathy and in, 2/3 of the cases, by neurological decline (e.g., the severe phenotype) [1,2]. These patients need a multidisciplinary approach for their management. Enzymatic replacement therapy is an important new therapy for patients with MPS II[14].

MPS II is an traditionally considered X-linked disease as a recessive condition, and carriers are usually thought to be clinically healthy. [1,14]. At least ten females with MPS II have already been reported in the literature [15-23] and all of them show the typical signs found in hemizygotes (usually the neuropathic phenotype). The development of the disease in these women was associated with skewed X-inactivation in all of them. However, in other X-linked disorders, such as Fabry disease [25-32], X-linked Adrenoleukodystrophy [33-36], and Duchenne Muscular Dystrophy [37-40], a variable percentage of heterozygotes may show some signs or symptom of the disease, usually in a milder degree than that seen in hemizygotes. This phenomenon is explained, by the majority of experts, as different degrees of inactivation in the X-chromosome [32,33,41-44].

This article reviews 40 potential heterozygotes for MPS II regarding the presence of subtle signs and symptoms of this disease.

MATERIAL AND METHODS

This observational and transversal study was approved by the local Institutional Ethics Committee of the Hospital de Clínicas Porto Alegre (HCPA), Brazil. The Medical Genetics Service (MGS) of HCPA is a reference center for diagnosis and management of

MPS disorders in Brazil. The mothers and other female relatives of male MPS II patients were seen at MGS-HCPA outpatient clinics and invited to participate in this study. Informed consent was obtained from these females before they enrolled in the study.

The interview and physical exam were performed always by the same physician, and information regarding the following data was obtained: age, parental consanguinity, degree of relationship, menarche, number of pregnancies and miscarriage. The anamnesis was focused on cardiological, pulmonary, bone and gastric problems. Physical exam was focused in the signs and symptoms of MPS II disease.

The women were classified as heterozygote or non-heterozygote based on molecular analysis of the *IDS* gene (data not shown). Analysis of the plasma and leukocyte, IDS activities and urinary levels of GAGs were performed at the laboratory of MGS-HCPA (LREIM), which is a reference laboratory for the diagnosis of lysosomal diseases in Latin America. The IDS activity was measured following the method described by Voznyi et al 2001 [45]. Normal values references were: 122-463 nmoles/4h per mL for assay in plasma and 31-110 nmoles/4h per mg protein for the assay in leukocytes. The quantification of GAGs in urine sample was performed according to de Jong et al, 1992 [46]. Normal reference values for urinary GAGs were: 13-45mg/mmoL creatinine for adults. It was also performed karyotype in blood cells using standard protocols [47,48]. Genomic DNA extracted from peripheral lymphocytes was assayed for X inactivation at the androgen receptor (HUMARA) locus [49]. A cut-off value of 80% for X-inactivation ratios was defined as skewed inactivation [50].

Brain magnetic resonance imaging (MRI) was performed on a 1.5TMR system. Liver, spleen and spine were evaluated on CT scans. For the analysis of cerebral MRI variables we measured the normalized cerebral volume and normalized ventricular volume, checked for brain lesions on FLAIR [51]. For liver and spleen volume we also used the Image J software [52] from the National Institute of Health (NIH). This software has both semi-automated and an automated segmentation tools. Volumes were counted in voxels using the Voxel Counter plug-in of Image J software. For spine we analyzed the height of the vertebral body to detected MPS bone changes and categorized scans in 2 groups (normal and abnormal). Additionally, a radiological classification was done to categorize

hepatomegaly (2 cm below the right kidney as mild; between 2-4cm as moderate and more than 4 cm as severe) and splenomegaly (length between 12-14 cm as mild; between 14-16cm as moderate or more than 16cm as severe). The interpretations were performed by two independent imaging specialists and both were blind regarding the heterozygote or non-heterozygote state of the subjects.

Data were grouped into a Microsoft Excel spreadsheet and further analyzed using the Statistical Package for Social Sciences (SPSS) 16.0. Variables with data available to more than 50% of the sample were analyzed. Categorical variables were summarized by means of frequencies and percentages. Kolmogorov–Smirnov and Shapiro-Wilk tests were applied to verify the distribution of the variables. Continuous variables with asymmetric distribution were summarized by median and interquartile range values (25-75th). To compare the groups, it was used the Mann-Whitney U-test, applying Bonferroni's correction.

RESULTS

Among the 40 women included in this study, from 24 families, 22 were heterozygotes and 18 were non-heterozygotes, according to the DNA analysis. All women had normal physical exams and karyotypes. Clinical data, biochemical and radiological results are summarized on **Figures 1-3** and **Tables 1-2**. Applying the Bonferroni's correction, the groups (heterozygotes and non-heterozygotes) differed significantly only regarding the IDS activities in leukocyte and in plasma.

Miscarriage was observed in 4/22 heterozygotes and in 5/18 non-heterozygotes. A non-heterozygote had 3 miscarriage events but she was found to present randomic X-inactivation pattern. All women experienced the miscarriage below the age of 30 years.

It was not possible to obtain the imaging exams in all women due to technical and logistic reasons. Out of 14 heterozygotes, that had performed abdominal CT, five were classified as having hepatomegaly (4 mild and one moderate); in 17 non-heterozygotes, 3 had hepatomegaly (2 mild and one moderate). Splenomegaly was perceived in 2

heterozygotes (both mild) and in 2 non-heterozygotes (one mild and one moderate). We did not find any alteration in vertebrae which could be related to MPS II disease.

It was possible to perform the HUMARA assays in 31 women (10/14 heterozygotes and 15/17 non-heterozygotes). Among the heterozygotes, 4 were non informative (homozygotes), 8 presented randomic pattern of X inactivation and only 2 presented with skewed X inactivation. Regarding non-heterozygotes, 2 were non informative, 6 had non-skewed pattern and 9 had skewed X inactivation.

DISCUSSION

This is the first paper that reports results of imaging exams and the pattern of X inactivation in a sample of MPS II carriers.

In the process of Lyonization, one of the X chromosomes is randomly inactivated during early embryonic stages and becomes visible as Barr body. All descendants of each cell will be inactivated on the same pattern and a heterozygote for a X-linked disease will be a mosaic for these two cell populations. As a consequence, in some disorders it is found a “mosaic” or “patchy” symptoms in heterozygote females. More often, variability in X inactivation can lead to a milder and more variable clinical and biochemical phenotype in females than males [53,54].

X-linked diseases are the most important genetic conditions for carriers detection so the genetic counseling in these families are very challenging. Carriers are usually healthy and likely to reproduce, with the high risk of giving birth to an affected male offspring. In these families it is often unwise to give a definite risk until the information from testing is available [55] However, new concepts are emerging due to the clinical heterogeneity observed in some conditions not fit the traditionally X-linked recessive and dominant concepts [55,56].

According to the literature, some MPS II heterozygotes that were clinically affected had structural alterations in her karyotypes [16-18]. In our results, all women had normal karyotypes and we did not perceive any association with the pattern of X inactivation. In

eleven non-heterozygotes, from the same family, it was observed a skewed X inactivation pattern in 8 women suggesting a heritable X inactivation pattern.

Also, some authors suggest a relation among the increase of miscarriage incidences in heterozygotes for X-linked diseases [57,58] but we did not confirm this finding.

In this present study we did not find any correlation between the pattern of X-inactivation and the heterozygote or non-heterozygote status. Due to these results, we postulated that: 1) the sample size was too small to detect differences between the groups or 2) the pattern of X-inactivation in the “non affected heterozygotes” does not influence the expression of the disease in these females.

Although some heterozygotes showed hepatomegaly and/or splenomegaly, this was also observed in non-heterozygotes. We postulate that this can be a spurious result.

We did not find any sign and/or symptom related with MPS II disease in the heterozygote females. This can be attributed to the adequate cross-correction between the IDS deficient and normal cells [53].

We found difference of IDS in leukocytes and in serum between the 2 groups. However we do not recommend these enzymatic analysis to discriminate heterozygotes from non-heterozygotes, as the overlap between these states (heterozygotes and non heterozygotes) is quite significant. The molecular analysis of the IDS gene is still the gold standard to correctly identify the carriers.

CONCLUSIONS

It seems that, unlike other X-linked diseases, MPS II heterozygotes usually do not show any clinical sign of the disease. Our findings also suggest there is no relation between the absence of clinical signs in these females and the occurrence of a skewing pattern favorable of X inactivation. This study, which was the first to evaluate, in a comprehensive way, a sample of MPS II heterozygotes looking for subtle signs and symptoms of this disease, suggests that MPS II shows a low penetrance in heterozygotes. However, due to

the small size of our sample, we suggest that additional studies should be performed to confirm these results.

CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

There are no conflicts of interest associated with this publication.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors of this work are grateful for the fellowships provided by CAPES through the Postgraduate Program in Child and Adolescent Medicine/UFRGS. The authors also thanks for the support of MPS Barsil Network.

REFERENCES

- [1] E.F. Neufeld, J. Muenzer. The Mucopolysaccharidoses, in: Scriver C.R., Beaudet A.L., Sly W.S., Valle D (Eds.), *The metabolic and molecular basis of inherited disease*, MacGraw-Hill, New York, 2001, pp.3421-3452.
- [2] I.D. Young, P.S. Harper, I.M. Archer, R.G. Newcombe, A clinical and genetic study of Hunter's syndrome 1. Heterogeneity, *J. Med. Genet.* 19 (1982) 401-407.
- [3] T. Schaap, G. Bach, Incidence of mucopolysaccharidosis in Israel: is Hunter disease a "Jewish disease"?, *Hum. Genet.* 56 (1980) 221-223.
- [4] G. Machili, G. Barbujani, G.A. Danieli, F.H. Hermann, Segregation and sporadic cases in families with Hunter's syndrome, *J. Med. Genet.* 13 (1991) 417-422.
- [5] J. Nelson, Incidence of the mucopolysaccharidoses in Northern Ireland, *Hum. Genet.* 101 (1997) 355-358.
- [6] 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) 151-160.
- [7] P.J. Meikle, J.J. Hopwood, A.E. Clague, W.F. Carey, Prevalence of lysosomal disorders, *JAMA* 281 (1999) 249-254.
- [8] D.A. Applegarth, J.R. Toone, R.B. Lowry, Incidence of metabolism in British Columbia, 1968-1006, *Pediatrics* 105 (2000) e10.
- [9] J. Nelson, J. Crowhust, B. Carey, L. Greed, Incidence of the mucopolysaccharidosis in Western Australia, *Am. J. Med. Genet.* 123A (2003) 310-311.
- [10] F. Baehner, C. Schmiedeskamp, F. Krummenauer, E. Miebach, M. Baibouj, C. Whybra, A. Kohlschütter, C. Kampmann, M. Beck, Cumulative incidence of the mucopolysaccharidosis in Germany, *J. Inherit. Metab. Dis.* 28 (2005) 1011-1017.
- [11] S.P. Lin, J.H. Chang, G.J. Lee-Chen, H.Y. Lin, C.K. Chuang, Detection of Hunter syndrome (mucopolysaccharidosis type II) in Taiwanese: biochemical and linkage studies of the iduronate-2-sulfatase gene defects in MPS II patients and carriers, *Clin. Chim. Acta.* 369 (2006) 29-34.
- [12] H.Y. Lin, S.P. Lin, C.K. Chuang, D.M. Niu, M.R. Chen, F.J. Tsai, M.C. Chao, P.C. Chiu, S.J. Lin, L.P. Tsai, W.L. Hwu, J.L. Lin, Incidence of the mucopolysaccharidosis in Taiwan, 1984-2004, *Am. J. Med. Genet. A.* 149 (2009) 960-964.
- [13] Giugliani R. MPS Brazil Network (2009). Personal communication.
- [14] J.E. Wraith, M. Scarpa, M. Beck, A.O. Bodamer, L. de Meleir, N. Guffon, A. Meldgaard Lund, G. Malm, A.T. van der Ploeg, J. Zeman, Mucopolysaccharidosis type II (Hunter syndrome): a

clinical review and recommendations for treatment in the era of enzyme replacement therapy, *Eur. J. Pediatr.* 167 (2008) 267-277.

[15] K. Tuschl, A. Gal, E. Paschke, S. Kircher, O.A. Bodamer, Mucopolysaccharidosis type II in females case report and review of literature, *Pediatr. Neurol.* 32(2005) 270-272.

[16] E.F. Neufeld, C.J. Epstein, S. Yatziv, A. Milunsky, B.R. Migeon, The Hunter syndrome in females: is there an autosomal recessive form of iduronate sulfatase deficiency?, *Am. J. Hum. Genet.* 29 (1977) 455-456.

[17] J. Mosmann, R. Stephens, S. Blunt, E.E. Jones, M. Pembrey, Hunter's disease in a girl: association with X:5 chromosomal translocation disrupting the Hunter gene, *Arch. Dis. Child.* 58 (1983) 911-915.

[18] D.M. Broadhead, J.M. Kirt, A.J. Burt, V. Gupta, P.M. Ellis, G.T. Besley, Full expression of Hunter's disease in a female with an X-chromosome deletion leading to non-random inactivation, *Clin. Genet.* 20 (1986) 392-398.

[19] J.T. Clarke, W.L. Greer, P.M. Strasberg, R.D. Pearce, M.A. Skomorowski, P.N. Ray, Hunter disease (mucopolysaccharidosis type II) associated with unbalanced inactivation of X chromosomes in a karyotypically normal girl, *Am. J. Hum. Genet.* 49 (1991) 289-297.

[20] B. Winchester, S. Geddes, S. Genet, J. Hurst, H. Middleton-Price, N. Williams, M. Webb, A. Habel, S. Malcom, Female twin Hunter disease due to nonrandom inactivation of the X-chromosome: a consequence of twinning, *Am. J. Med. Genet.* 44 (1992) 834-838.

[21] K. Sukegawa, X.Q. Song, M. Masuno, T. Fukao, N. Shimozawa, S. Fukuda, K. Isogai, H. Nishio, M. Matsuo, S. Tomatsu, N. Kondo, T. Orri, Hunter disease in a girl caused by R468Q mutation in the iduronate-2-sulfatase gene and skewed inactivation of the X chromosome carrying the normal allele, *Hum. Mut.* 10 (1997) 316-317.

[22] K. Sukegawa, T. Matsuzaki, S. Fukuda, M. Masuno, T. Fukao, M. Kokutyu, S. Iwata, S. Tomatsu, T. Orri, N. Kondo, Brother/sister siblings affected with Hunter disease: evidence for skewed X chromosome inactivation, *Clin. Genet.* 53(1998) 96-101.

[23] S. Cudry, I. Tigaud, R. Frossairt, V. Bonnet, I. Marie, D. Bozon, MPS II in females: molecular basis of two different cases, *J. Med. Genet.* 37 (2000) e29.

[24] Y. Doi, G. Toda, K. Yano, Sisters with atypical Fabry's disease with complete atrioventricular block, *Heart.* 89 (2003) e2.

[25] L.S. Ro, S.T. Chen, L.M. Tang, W.C. Hsu, H.S. Chang, C.C. Haung, Current perception threshold testing in Fabry's disease, *Muscle Nerve* 22 (1999) 1531-1537.

[26] A.L. Gibas, R. Klatt, J. Johnson, J.T.R. Clarke, J. Katz, Disease rarity carrier status and gender: a triple disadvantage for women with Fabry disease, *J. Genet. Couns.* 17 (2008) 528-537.

[27] P. B. Deegan, F. Bahner, M-A. Barba Romero, D.A. Hughes, C. Kapmann, M. Beck and on behalf of European FOS Investigators, Natural history of Fabry disease in females in the Fabry outcome survey, *J. Med. Genet.* 43 (2005) 347-352.

[28] T. Levade, F. Giordano, A. Maret, M.C. Margery, J. Bazex, R. Salvayre, Different phenotypic expression of Fabry disease in female monozygotic twins, *J. Inher. Metab. Dis.* 14 (1991) 105-106.

- [29] F. Baenher, C. Kapmann, C. Whybra, E. Miebach, C.M. Wiethoff, M. Beck, Enzyme replacement therapy in heterozygous females with Fabry disease: results of a phase IIIB study, *J. Inher. Metab. Dis.* 26 (2003) 617-627.
- [30] K.D. MacDermont, A. Kolmes, A.H. Miners, Natural history of Fabry disease in affected males and obligate carrier females, *J. Inher. Metab. Dis.* 24 (Suppl 2) (2001) 13-14.
- [31] E.M. Maier, S. Osterrieder, C. Whybra, M. Ries, A. Gal, M. Beck, A.A. Roscher, A.C. Muntau, Disease manifestations and X inactivation in heterozygous females with Fabry disease, *Acta. Paediatr. Suppl.* 34 (2006) 30-38.
- [32] A. Mehta, R. Ricci, U. Widmer, F. Dehout, A. Garcia de Lorenzo, C. Kapmann, A. Linhart, G. Sunder-Plasmann, M. Ries, M. Beck, Fabry disease defined: baseline clinical manifestations of 366 patients in the Fabry Outcome Survey, *Eu. J. Clin. Invest.* 34 (2004) 236-242.
- [33] B.R. Migeon, H.W. Moser, A.B. Moser, J. Axelman, D. Silence, R.A. Norum, Adrenoleukodystrophy: evidence for X linkage, inactivation, and selection favoring the mutant allele in heterozygous cells, *Proc. Natl. Acad.* 78 (1981) 5066-5070.
- [34] E. Watkiss, T. Webb, S. Bunday, Is skewed responsible for symptoms in female carriers for adrenoleukodystrophy? *J. Med. Genet.* 30 (1993) 651-654.
- [35] B.P. O'Neill, H.W. Moser, K.M. saxena, L.C. Marmion, Adrenoleukodystrophy: clinical and biochemical manifestations in carriers, *Neurology* 34 (1984) 798-901.
- [36] E.M. Maier, S. Kammer, A.C. Muntau, M. Whichers, A. Braun, A.A. Roscher, Symptoms in carriers of adrenoleukodystrophy relate to skewed X inactivation, *Ann. Neurol.* 52 (2002) 683-688.
- [37] A.E. Emery, Abnormalities of the electrocardiogram in females carriers of Duchenne muscular dystrophy, *Br. Med. J.* 2 (1969) 418-420.
- [38] P.E. Barkhaus, J.M. Gilchrist, Duchenne muscular dystrophy manifesting carriers, *Arch. Neurol.* 46 (1989) 673-675.
- [39] C.A. Sewry, A. Sansome, A. Clerk, T.G. Sherrat, N. Hasson, E. Rodillo, J.Z. Heckmatt, P.N. Strong, V. Dubowitz, Manifesting carriers of Xp21 muscular dystrophy; lack of correlation between dystrophin expression and clinical weakness, *Neuromuscul. Disord.* 3 (1993) 141-148.
- [40] E.M. Hoogerwaard, E. Bakker, P.F. Ippel, J.C. Oosterwijk, D.F. Majoer-Krakauer, N.J. Leschot, A.J. van Essen, H.G. Brunner, P.A. van der Wouw, A.A. Wilde, M. de Visser, Signs and symptoms of Duchenne muscular dystrophy and Becker muscular dystrophy among carriers in the Netherlands: a cohort study, *Lancet* 353 (1999) 2116-2119.
- [41] R.J. Desnick, Y.A. Ioannou, C.M. Eng. α galactosidase A deficiency: Fabry disease, in Scriver C.R., Beaudet A.L., Sly W.S., Valle D (Eds.), *The metabolic and molecular basis of inherited disease*, MacGraw-Hill, New York, 2001, pp 3773-74.

- [42] P.Ashton-Prolla, G.A. Ashley, R.F. Pires, R.J. Desnick, C.M. Eng, Fabry disease:comparison of enzymatic, linkage and mutation analysis for carrier detection in a family with a novel mutation (30delG), *A. J. Med. Genet.*84 (1999) 420-424.
- [43] C. Whybra, I. Willers, J.Davies, B. Whinchester, J. Kriegsmann, K. Bruhl, A. Gal. S. Bunge, M. Beck, Anderson-Fabry disease: clinical manifestations of the disease in female heterozygotes *J. Inherit. Metab. Dis.* 24 (2001) 715-724.
- [44] M. Yoshioka, T. Yorifuri, I. Mituyoshi, Skewed X inactivation in manifesting carriers of Duchenne muscular dystrophy, *Clin. Genet.*53 (1998) 102-107.
- [45] Y.V. Voznyi, J.L. Keulemans, O.P.van Diggelen, A fluorimetric enzyme assay for yhe diagnosis of MPS II (Hunter disease), *J.Inherit. Metab. Dis.* 24 (2001) 675-680.
- [46] J.G. de Jong, R.A. Weyers, R. Liebrand-van Sambeek, Measuring urinay glycosaminoglicans in the presence of protein: an improved screening procedure for mucopolysaccharidoses based on dimethylmethylene blue, *Clin. Chem.* 38 (1992) 803-807.
- [47] M. Seabright, A rapid technique for human chromosomes, *Lancet.* 2 (1971) 971-972.
- [48] P.S. Moorhead, P.C. Nowell, W.J. Mellmann, D.M. Battips, D.A. Hungerford, Chromosome preparations of leukocytes cultured from peripheral blood, *Exp. Cell. Res.* 61 (1960) 613-616.
- [49] R.C. Allen, H.Y. Zoghbi, A.B. Moseley, J.W. Belmont, Methylation of *HpaII* and *HhaI* sites near the polymorphic CAG repeat in the human androgen-receptor gene correlates with X chromosome inactivation, *Am. J. Hum. Genet.* 51 (1992) 1220-1239.
- [50] T. Kubota, S. Nonoyama, H. Tonoki, M. Masuno, K. Imaizumi, M. Kojima, K. Wakui, M. Shimadzu, Y. Fukushima, A new assay for the analysis of X-chromosome inactivation based on methylation-specific PCR, *Hum. Genet.* 104 (1999) 49-55.
- [51] L. Vedolin, I.V. Schwartz, M. Komlos, A. Schuch, A.C. Puga, L.L. Pinto, A.P. Pires, R. Giugliani, Correlation of MR imaging and MR spectroscopy findings with cognitive impairment in mucopolysaccharidosis II, *Am. J. Neuroradiol.* 28 (2007) 1029-1033.
- [52] Imaging and processing analysis in JAVA. <http://rsb.info.nih.gov/ij>. Last access in 28 July 2009.
- [53] M. F. Lyon, Gene Action in the X-chromosome of the Mouse (*Mus musculus* L.), *Nature* 190 (1961) 732-373.
- [54] Migeon B, Pappas K, *Females are Mosaics: X inactivation and sex differences in disease*, first ed., Oxford University Press, New York & London, 2007.
- [55] Atul Mehta, Michael Beck, Gere Sunder-Plasmann, *General aspects of X linked diseases in Fabry disease perspectives from 5 years of FOS*, first ed., OXFORD Pharmagenesis, United Kingdom, 2006.
- [56] W.B. Dobyns, A. Filauro, B.N. Tomson, A.S. Chan, A.W. Ho, N.T. Ting, J.C. Osterwijk, C. Ober, Inheritance of most X-linked traits is not dominant or recessive, just X-linked, *Am. J. Med. Genet. A* 129 (2004) 136-143.

[57] M.C. Lanasa, W.A. Hogge, C. Kibik, J. Blancato, E.P. Hoffman, Highly skewed X-chromosome inactivation is associated with idiopathic recurrent spontaneous abortion, *Am. J. Hum. Genet.* 65 (1999) 252-254.

[58] R.M. Plenge, R.A. Stevenson, H.A. Lubs, C.E. Schwartz, H.F. Willard, Skewed X-chromosome inactivation is a common feature of X-linked mental retardation disorders *Am. J. Hum. Genet.* 71 (2002) 168-173.

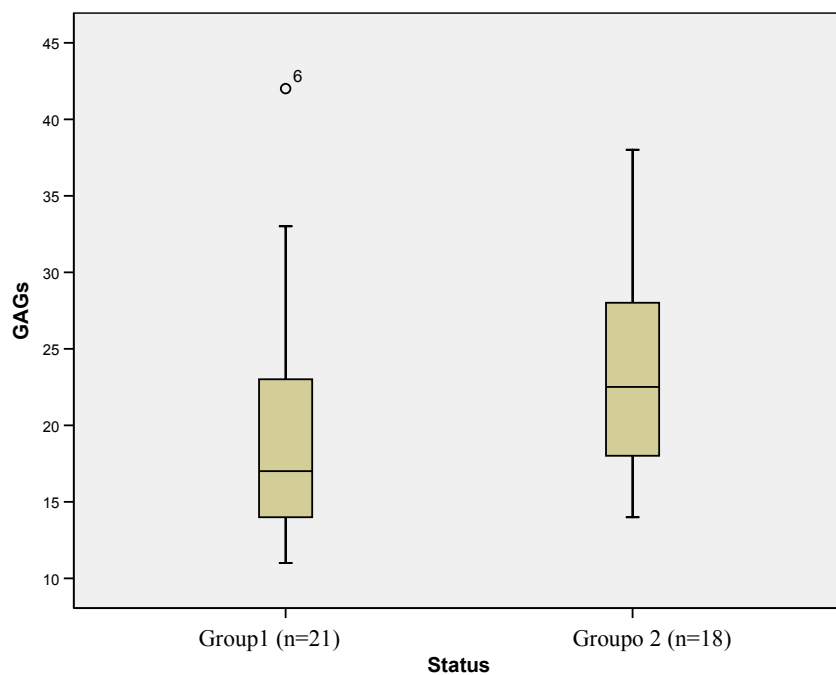


Figure 1. Comparison between heterozygotes (group 1) and non-heterozygotes (group 2) regarding levels of urinary GAGs (Normal range values 13-45mg/mmoL creatinine; p=0.6)

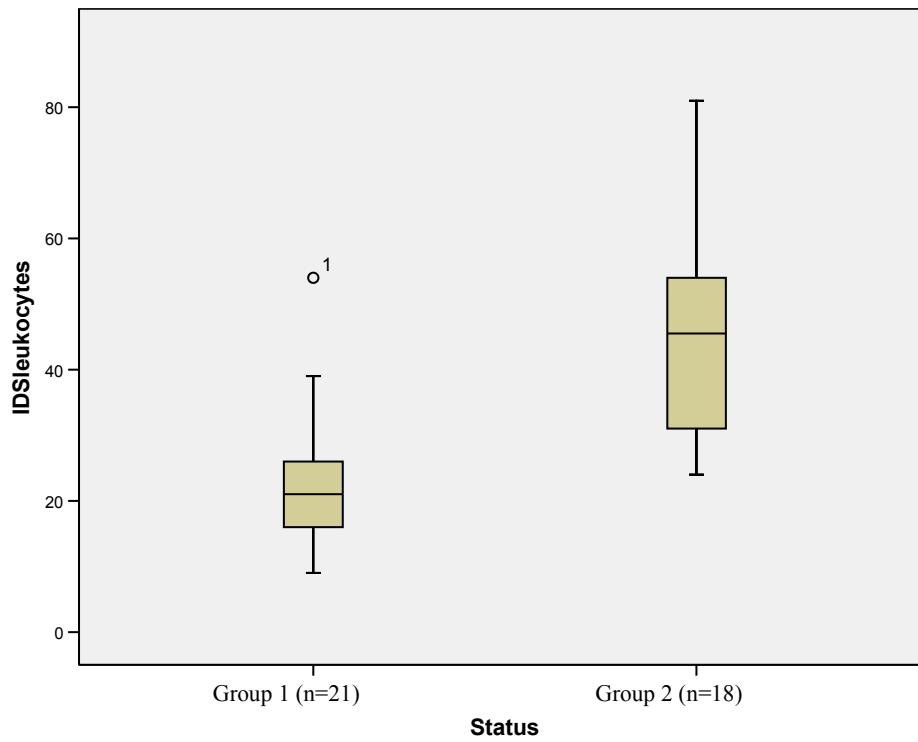


Figure 2. Comparison between heterozygotes (group 1) and non-heterozygotes (group 2) regarding activity of IDS in leukocytes (Normal range values 31-110 nmoles/4h per mg prot; $p < 0.001$).

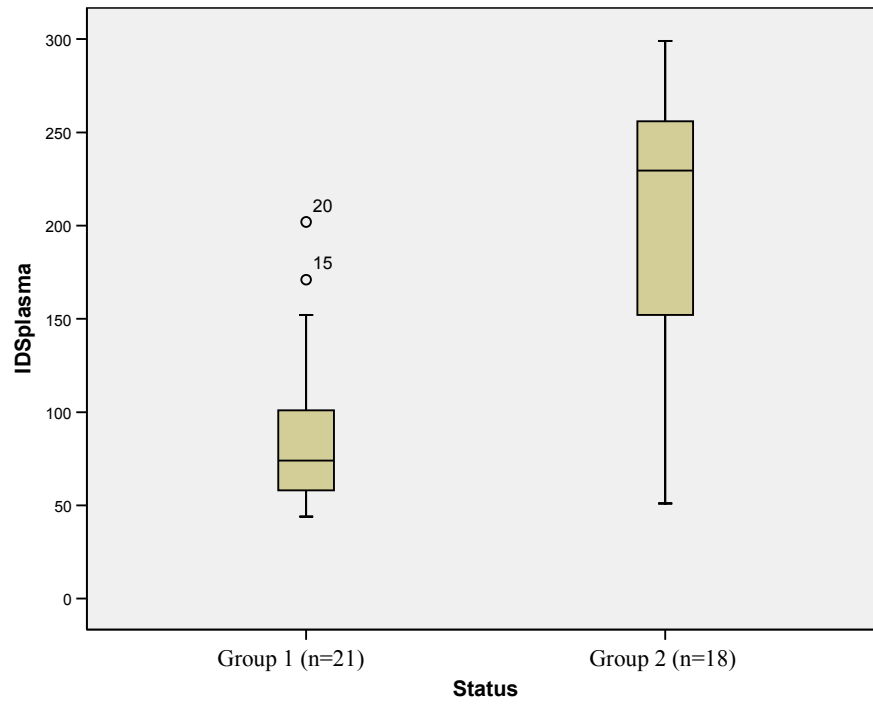


Figure 3. Comparison between heterozygotes (Group 1) and non-heterozygotes (Group 2) regarding activity of IDS in plasma (Normal range values 122-463 nmoles/4h per mL; p value <0.001)

Table 1. MPS II heterozygotes X non-heterozygotes regarding: age, height, weight, cephalic perimeter and menarche

	Heterozygotes (n=22)	Non-heterozygotes (n=18)	p-value
Age (years)			
Median	35	38.5	0.7
IR ¹	32.7-40.7	22.2-49.2	
Range	22-55	15-75	
Height (cm)			
Median	159.5	160.5	0.6
IR ¹	155.5-163.2	156.7-163	
Range	148-172	153-170	
Weight (kg)			
Median	60.5	60.5	0.9
IR ¹	55.5-71.2	54.7-73	
Range	48-119	47-82	
Cephalic perimeter (cm)			
Median	55	54	0.9
IR ¹	53-57	53-55	
Range	52-58	52-57	
Menarche (years)			
Median	12	11	0.3
IR ¹	11-13.2	12-14	
Range	9-15	11-14	

IR¹ Interquartile range 25-75th

Table 2. Imaging results in MPS II heterozygotes and non-heterozygotes

	Heterozygotes (n=22)	Non-heterozygotes (n=18)	p-value
Normalized Hepatic volume ¹ (%)			
n	14	16	
Median	14,6	15,4	
IR ²	12.1-16.2	13.2-16.2	0.3
Range	10-18.5	10.8-19.2	
Hepatic volume (cm ³)			
n	17	17	
Median	1605.9	1498.1	
IR ²	1377.9-1701.3	1232.6-1682.6	0.3
Range	858.5-2892.2	822.1-2200.8	
Normalized Spleen volume ³ (%)			
n	14	16	
Median	2	1.5	
IR ²	1.7-2.5	1.2-2.2	0.03*
Range	1.3-3.9	0.6-3.2	
Spleen volume (cm ³)			
n	12	16	
Median	190.8	137.1	
IR ²	126.6-262.8	114.2-205.3	0.1
Range	56.3-421	87.1-257.2	
Normalized cerebral volume ⁴ (%)			
n	7	15	
Median	46.5	46.7	
IR ²	42.4-48.7	44.1-49.1	0.5
Range	41.7-49	41.9-51.8	
Brain Lesions ⁵ (%)			
n	7	15	
Median	0.1	0.1	
IR ²	0.1-0.3	0-0.2	0.5
Range	0-0.7	0-1	
Normalized Ventricular volume ⁶ (%)			
n	7	15	
Median	0.6	0.3	
IR ²	0.4-0.6	0.2-0.6	0.1
Range	0.3-1.1	0.1-1.2	

¹Normalized hepatic volume= hepatic volume (voxels)/ abdominal volume (voxels);

²IR: Interquartile range 25-75th;

³Normalized spleen volume= spleen volume (voxels)/abdominal volume (voxels);

⁴Normalized cerebral volume= cerebral volume (voxels)/ total volume (voxels);

⁵Brain lesions= lesions (voxels/total cerebral volume (voxels);

⁶Normalized ventricular volume= ventricular volume (voxels)/ cerebral skull (voxels);

* Applying Bonferroni's correction, this value is non statically significant.

8.2 AS HETEROZIGOTAS PARA MPS II SÃO REALMENTE ASSINTOMÁTICAS? UM ESTUDO BASEADO EM DADOS CLÍNICOS, BIOQUÍMICOS, ANÁLISE DA INATIVAÇÃO DO CROMOSSOMO X E AVALIAÇÕES DE IMAGEM.

Louise Lapagesse de Camargo Pinto^{1,3}, Ida Vanessa Doerdelein Schwartz^{2,3}, Sharbel Maluf³, Sandra Leistner-Segal³, Camila Zimmer da Silva³, Ana Brusius-Facchin³, Silvia Brustolin³, Maira Graef Burin³, Juan Llerena⁴, Lucia Moraes⁵, Leonardo Vedolin⁶, Alice Schuch⁶, Roberto Giugliani^{1,2,3}

Autor para correspondência e endereço:

Rua Ramiro Barcelos 2350 3º andar, Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, RS, Brasil

CEP 90035-903

Fone 51 3359 8011

Fax +51 3359 8010

email: loulapagesse@ibest.com.br

¹ Programa de Pós Graduação da Saúde da Criança e do Adolescente , UFRGS, Porto Alegre, Brasil

² Departamento de Genética, UFRGS, Porto Alegre, Brasil

³ Serviço de Genética Médica, HCPA, Porto Alegre, Brasil

⁴ Instituto Fernandes Figueira, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brasil

⁵ Instituto Nacional do Câncer, INCA, , Rio de Janeiro, Brasil

⁶ Hospital Moinhos de Vento, HMV, Departamento de Radiologia, Porto Alegre, Brasil

RESUMO

Introdução: as doenças ligadas ao cromossomo X são mais prevalentes em homens, mas em algumas delas a expressividade e a penetrância nas mulheres são praticamente semelhante às encontradas no sexo masculino. Em relação à mucopolissacaridose tipo II (MPS II), não existem estudos na literatura na busca da identificação de sinais e sintomas sutis nas heterozigotas.

Objetivos: comparar as heterozigotas com as não heterozigotas para MPS II a fim de testar a hipótese de que as heterozigotas podem apresentar manifestações sutis da doença.

Material e métodos: estudo observacional e transversal que coletou dados de 40 mulheres brasileiras com história familiar positiva para MPS II, obtidos a partir de anamnese, exame físico, cariótipo, padrão de inativação do cromossomo X, atividade da iduronato sulfatase (IDS) em leucócitos e plasma, níveis de glicosaminoglicanos na urina, tomografias computadorizadas (TC) de abdomen e de coluna e ressonância magnética de crânio.

Resultados: de acordo com a análise do DNA, 22 mulheres foram classificadas em heterozigotas e 18 em não heterozigotas (médias de idade de 35 e 38,8 anos respectivamente). Não foram encontradas anormalidades no exame físico (n=40), cariótipo (n=31/40) e tomografia de coluna (n=31/40). Ambos os grupos diferiram em relação à atividade da IDS em plasma ($p<0,001$) e leucócitos ($p<0,001$), as quais foram mais baixas nas heterozigotas. Aplicando a correção de Bonferroni, não foi encontrada nenhuma diferença entre os grupos em relação às demais variáveis. O padrão de inativação do cromossomo X apresentou desvio em 2 heterozigotas e em 9 não heterozigotas.

Conclusões: não foi encontrada evidência de presença de manifestação clínica sutil ou sinal radiológico sugestivo de MPS II nas heterozigotas. Os achados sugerem que não existe relação entre a ausência de sinais clínicos nessas mulheres e a ocorrência de um padrão favorável de inativação do cromossomo X. Esses dados corroboram a hipótese de que essa doença apresenta uma baixa penetrância nas heterozigotas para MPS II.

Palavras chaves: inativação do cromossomo X, detecção de portadoras, iduronato sulfatase, glicosaminoglicanos, mucopolissacaridose tipo II.

INTRODUÇÃO

A Mucopolissacaridose tipo II (MPS II; OMIN 309900) é uma doença lisossômica ligada ao cromossomo X causada pela deficiência da atividade da enzima iduronato-2-sulfatase IDS; EC 3.1.6.13). Essa enzima é responsável pela degradação dos glicosaminoglicanos (GAGs) sulfato de heparan e dermatan. Em pacientes com MPS II existe acúmulo desses GAGs parcialmente degradados em vários órgãos e tecidos [1]. A incidência estimada dessa doença varia de 1:68,000 a 1:320,000 recém nascidos [2-10]. É a MPS mais frequente em Taiwan e no Norte da Ásia [11-12] e também a mais frequentemente diagnosticada no Brasil [13].

Os pacientes do sexo masculino são caracterizados por apresentar uma doença crônica e progressiva com obstrução grave da via aérea, deformidades esqueléticas (disostose múltipla), hepatoesplenomegalia, cardiomiopatia e, em 2/3 dos casos, regressão neurológica (por exemplo, no fenótipo grave) [1,2]. Esses pacientes necessitam de uma abordagem multidisciplinar para o seu manejo. A terapia de reposição enzimática é uma importante terapia inovadora para os pacientes com MPS II e o diagnóstico precoce para essa doença deve ser promovido [14].

A MPS II é uma doença ligada ao cromossomo X tradicionalmente considerada como uma condição recessiva e as heterozigotas são usualmente ditas como clinicamente saudáveis [1,14]. Pelo menos 10 pacientes do sexo feminino com MPS II já foram descritas na literatura [15-23] e todas apresentaram os sinais típicos encontrados nos hemizigotos (habitualmente o fenótipo neuronopático). O desenvolvimento da doença nessas mulheres foi associado ao desvio da inativação do cromossomo X em todas as pacientes. Entretanto, em outras doenças ligadas ao cromossomo X, como doença de Fabry [25-32], Adrenoulecodistrofia ligada ao cromossomo X [33-36], Distrofia Muscular de Duchenne [37-40], uma porcentagem variável de heterozigotas pode apresentar sinais ou sintomas da doença, e usualmente num grau mais leve que os hemizigotos. Esse fenômeno é explicado, pela maioria dos especialistas, através dos diferentes graus de inativação no cromossomo X [32,33,41-44].

Esse artigo revisa 40 potenciais heterozigotas para MPS II em relação à presença de sinais e sintomas sutis dessa doença.

MATERIAL E MÉTODOS

Esse estudo observacional e transversal foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) Brasil. O Serviço de Genética Médica (SGM) do HCPA é um centro de referência para o diagnóstico e manejo das mucopolissacaridoses (MPS) no Brasil. As mães e outras familiares do sexo feminino de pacientes com MPS II acompanhados no ambulatório do SGM-HCPA foram convidadas à participar desse estudo. Um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido foi aplicado nessas mulheres antes da participação no estudo.

Anamnese e exame físico foram realizados sempre pelo mesmo médico e as informações obtidas foram: idade, consaguinidade, grau de parentesco, estado de portador (heterozigota ou não heterozigota), menarca, número de gestações e de abortamentos espontâneos. A anamnese foi focada nos problemas cardiológicos, pulmonares, ósseos e no trato gastro intestinal. O exame físico foi direcionado nos sinais e sintomas de MPS II.

As mulheres foram classificadas em heterozigotas e não heterozigotas baseadas na análise do gene *IDS* (dados não descritos). Análises no plasma e em leucócitos da atividade da IDS e a determinação dos níveis urinários dos GAGs foram realizados no laboratório do SGM-HCPA, que é um serviço de referência para o diagnóstico das doenças lisossômicas na América Latina.

A atividade da IDS foi medida através do método descrito por Voznyi et al, 2001 [45]. Os valores normais de referência foram: 122-463 nmoles/4h por mL para os ensaios em plasma e 31-110 nmoles/4h por mg de proteína para os ensaios em leucócitos. A quantificação dos GAGs em amostra de urina foi de acordo com de Jong et al, 1992 [46]. O valor de referência para os GAGs urinários foi de: 13-45mg/mmoL de creatinina. Também foi realizado cariótipo em sangue periférico utilizando técnicas já padronizadas [47,48]. DNA genômico extraído de leucócitos periféricos foi utilizado para o ensaio da inativação do cromossomo X no locus do receptor de andrógeno (HUMARA) [49]. Foi considerada como taxa de desvio da inativação do cromossomo X a partir de 80% [50].

Ressonância magnética (RM) do crânio foi realizada em um sistema de 1.5 de alto campo. Fígado, baço e coluna foram avaliados através da tomografia computadorizada. Para a análise das variáveis cerebrais na RM foram mensurados o volume cerebral normalizado, o volume ventricular normalizado e a presença de lesões em *FLAIR* [51]. Para acessar os volumes do fígado e baço foi utilizado o programa de computador *Image J software* [52] do *National Institute of Health (NIH)*. Esse programa de computador possui ferramentas de segmentação semi-automáticas e automáticas. Os volumes foram contabilizados em *voxels* através do programa *Voxel Counter plug-in of Image J*. Na coluna vertebral foi analisada a altura do corpo vertebral para a detecção de alterações ósseas relacionadas à MPS e categorizadas em grupos (normal e alterada). Adicionalmente uma classificação radiológica foi realizada para a definição da hepatomegalia (2 cm abaixo do rim direito como leve; entre 2-4 cm moderada e maior que 4 cm como grave) e esplenomegalia (comprimento entre 12-14 cm como leve; entre 14-16 cm como moderada e maior que 16 cm como grave). A interpretação foi realizada por 2 especialistas independentes que estavam cegos quanto ao estado de heterozigota e não heterozigota.

Os dados foram agrupados numa tabela do *Microsoft Excel* e posteriormente analisados no *Statistical Package for Social Sciences (SPSS)16.0*. As variáveis presentes em mais de 50% na amostra foram analisadas. As variáveis categóricas foram sumarizadas em frequências e porcentagens. Os testes de Kolmogorov–Smirnov e Shapiro-Wilk foram aplicados para verificação da distribuição das variáveis. As variáveis contínuas que apresentaram distribuição assimétrica foram sumarizadas por intervalo interquartil. Para comparação dos grupos foi utilizado o teste U de Mann-Whitney aplicando a correção de Bonferroni.

RESULTADOS

Dentre as 40 mulheres incluídas nesse estudo, pertencentes a 24 famílias, 22 eram heterozigotas e 18 não heterozigotas (dados não descritos). Todas as mulheres apresentaram exame físico e cariótipos normais. Os dados clínicos, bioquímicos e radiológicos estão sumarizados nas **Figuras 1-3 e Quadros 1-2**.

Abortamento espontâneo foi observado em 4/22 heterozigotas e em 5/18 não heterozigotas. Três abortamentos foram apresentados pela mesma não heterozigota que apresentava o padrão randômico de inativação do cromossomo X. Todas as mulheres que apresentaram história de abortamento estavam abaixo dos 30 anos.

Não foi possível obter os exames de imagem de todas as mulheres devido à problemas técnicos e razões logísticas. Das 14 heterozigotas que realizaram a TC de abdomen, 5 foram classificadas com hepatomegalia (4 leve e uma moderada); entre as 17 não heterozigotas 3 apresentaram hepatomegalia (2 leve e uma moderada). Esplenomegalia foi observada em 2 heterozigotas (ambas leves) e 2 não heterozigotas (uma leve e outra moderada). Não foram encontradas alterações na coluna que poderiam estar relacionadas com MPS II.

Foi possível realizar o ensaio HUMARA em 31 mulheres (10/14 heterozigotas e 15/17 não heterozigotas). Dentre as heterozigotas 4 foram não informativas (homozigotas), 8 apresentavam o padrão normal de inativação e somente 2 apresentavam desvio da inativação do cromossomo X. Em relação às não heterozigotas, 2 foram não informativas, 6 apresentavam padrão randômico e 9 demonstraram desvio da inativação do cromossomo X.

DISCUSSÃO

Esse é o primeiro artigo que relata os resultados dos exames de imagem e o padrão de inativação do cromossomo X em uma amostra de heterozigotas para MPS II.

No processo de Lyonização, um dos cromossomos X é randomicamente inativado durante os estágios embrionários precoces e se torna visível como corpúsculo de Barr. Todas as descendentes de cada célula que será inativada apresentarão o mesmo padrão de inativação e uma heterozigota para uma doença ligada ao cromossomo X será mosaico para essas 2 populações celulares. Esse achado pode ter como consequência, em algumas doenças, um padrão de sintomas em “mosaico” nas mulheres heterozigotas. Mais frequentemente, a variabilidade da inativação do cromossomo X pode levar a sintomas

mais leves e a um fenótipo clínico e bioquímico mais variável nas heterozigotas do que nos homens [53,54].

As doenças ligadas ao cromossomo X são as doenças genéticas mais importantes para a detecção de heterozigotas e dessa forma o aconselhamento genético nessas famílias pode ser muito desafiador. As heterozigotas são usualmente saudáveis e capazes de se reproduzirem, apresentando o risco de gestarem um filho do sexo masculino afetado. Nessas famílias é imprudente dar um risco definitivo até que a informação baseada na testagem molecular esteja disponível [55]. Adicionalmente novos conceitos estão emergindo devido à heterogeneidade clínica observada em algumas condições que não seguem os conceitos dessa classificação tradicional em doenças ligadas ao cromossomo X recessivas e dominantes [55,56].

De acordo com a literatura, algumas heterozigotas sintomáticas para MPS II apresentam alterações estruturais no cariótipo [16-18]. Nos nossos resultados, todas as mulheres apresentaram cariótipos normais e não foi observada associação com a inativação do cromossomo X. Em uma família com 11 não heterozigotas 8 delas apresentaram desvio do padrão de inativação do cromossomo sugerindo um padrão herdável da inativação do cromossomo X.

Alguns autores sugerem uma relação entre o aumento do abortamento nas heterozigotas para doenças ligadas ao cromossomo X [57,58], mas nossos achados não confirmaram esses achados.

No presente estudo não foi encontrada correlação entre o padrão de inativação do cromossomo X e o estado de heterozigota ou não heterozigota. De acordo com esses resultados podemos sugerir: 1) que o tamanho amostral reduzido não foi capaz de detectar as diferenças entre os grupos ou 2) que o padrão da inativação do cromossomo X nas “heterozigotas não afetadas” não influencia na expressão da doença nessas mulheres.

Embora algumas heterozigotas tenham apresentado hepatomegalia e/ou esplenomegalia, esse achado também foi evidenciado nas não heterozigotas. Nós postulamos que esse é um resultado que foi encontrado ao acaso.

Não foram encontrados sinais e/ou sintomas relacionados à MPS II nas heterozigotas. Isso pode ser atribuído a uma adequada correção cruzada entre as células IDS deficientes e as células normais [53].

Foi encontrada diferença na atividade da dosagem da IDS em leucócitos e plasma entre os 2 grupos. Entretanto, não é recomendada que a análise enzimática seja utilizada para discriminar as heterozigotas das não heterozigotas, tendo em vista que a sobreposição dos valores entre esses 2 estados (heterozigotas e não heterozigotas) pode ser significativa. A análise molecular do gene da IDS ainda é o padrão-ouro para a identificação precisa das heterozigotas.

CONCLUSÃO

Ao contrário de outras doenças ligadas ao cromossomo X as heterozigotas para MPS II usualmente não apresentam sinal clínico da doença. Nossos resultados também sugerem não existir relação entre a ausência de sinais clínicos nessas mulheres e a ocorrência de um padrão favorável de desvio da inativação do cromossomo X. Esse estudo, o primeiro a avaliar, de modo compreensivo, uma amostra de heterozigotas para MPS II procurando sinais e sintomas sutis dessa doença, sugere que a MPS II apresenta uma baixa penetrância nas heterozigotas. Entretanto, devido ao pequeno tamanho amostral, nós sugerimos que estudos adicionais devam ser realizados para confirmar esses resultados.

CONFLITOS DE INTERESSE

Os autores declaram não existirem conflitos de interesse nessa publicação.

AGRADECIMENTOS

Os autores desse trabalho agradecem a CAPES pela bolsa de pós-graduação concedida pela Programa de Pós Graduação da Saúde da Criança e do Adolescente/UFRGS. A aluna também agradece ao apoio da Rede MPS Brasil.

REFERÊNCIAS

- [1] E.F. Neufeld, J. Muenzer. The Mucopolysaccharidoses, in: Scriver C.R., Beaudet A.L., Sly W.S., Valle D (Eds.), *The metabolic and molecular basis of inherited disease*, MacGraw-Hill, New York, 2001, pp.3421-3452.
- [2] I.D. Young, P.S. Harper, I.M. Archer, R.G. Newcombe, A clinical and genetic study of Hunter's syndrome 1. Heterogeneity, *J. Med. Genet.* 19 (1982) 401-407.
- [3] T. Schaap, G. Bach, Incidence of mucopolysaccharidosis in Israel: is Hunter disease a "Jewish disease"?, *Hum. Genet.* 56 (1980) 221-223.
- [4] G. Machili, G. Barbujani, G.A. Danieli, F.H. Hermann, Segregation and sporadic cases in families with Hunter's syndrome, *J. Med. Genet.* 13 (1991) 417-422.
- [5] J. Nelson, Incidence of the mucopolysaccharidoses in Northern Ireland, *Hum. Genet.* 101 (1997) 355-358.
- [6] 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) 151-160.
- [7] P.J. Meikle, J.J. Hopwood, A.E. Clague, W.F. Carey, Prevalence of lysosomal disorders, *JAMA* 281 (1999) 249-254.
- [8] D.A. Applegarth, J.R. Toone, R.B. Lowry, Incidence of metabolism in British Columbia, 1968-1006, *Pediatrics* 105 (2000) e10.
- [9] J. Nelson, J. Crowhust, B. Carey, L. Greed, Incidence of the mucopolysaccharidosis in Western Australia, *Am. J. Med. Genet.* 123A (2003) 310-311.
- [10] F. Baehner, C. Schmiedeskamp, F. Krummenauer, E. Miebach, M. Baibouj, C. Whybra, A. Kohlschütter, C. Kampmann, M. Beck, Cumulative incidence of the mucopolysaccharidosis in Germany, *J. Inher. Metab. Dis.* 28 (2005) 1011-1017.
- [11] S.P. Lin, J.H. Chang, G.J. Lee-Chen, H.Y. Lin, C.K. Chuang, Detection of Hunter syndrome (mucopolysaccharidosis type II) in Taiwanese: biochemical and linkage studies of the iduronate-2-sulfatase gene defects in MPS II patients and carriers, *Clin. Chim. Acta.* 369 (2006) 29-34.
- [12] H.Y. Lin, S.P. Lin, C.K. Chuang, D.M. Niu, M.R. Chen, F.J. Tsai, M.C. Chao, P.C. Chiu, S.J. Lin, L.P. Tsai, W.L. Hwu, J.L. Lin, Incidence of the mucopolysaccharidosis in Taiwan, 1984-2004, *Am. J. Med. Genet. A.* 149 (2009) 960-964.
- [13] Giugliani R. MPS Brazil Network (2009). Personal communication.
- [14] J.E. Wraith, M. Scarpa, M. Beck, A.O. Bodamer, L. de Meleir, N. Guffon, A. Meldgaard Lund, G. Malm, A.T. van der Ploeg, J. Zeman, Mucopolysaccharidosis type II (Hunter syndrome): a clinical review and recommendations for treatment in the era of enzyme replacement therapy, *Eur. J. Pediatr.* 167 (2008) 267-277.
- [15] K. Tuschl, A. Gal, E. Paschke, S. Kircher, O.A. Bodamer, Mucopolysaccharidosis type II in females case report and review of literature, *Pediatr. Neurol.* 32(2005) 270-272.

- [16] E.F. Neufeld, C.J. Epstein, S. Yatziv, A. Milunsky, B.R. Migeon, The Hunter syndrome in females: is there an autosomal recessive form of iduronate sulfatase deficiency?, *Am. J. Hum. Genet.* 29 (1977) 455-456.
- [17] J. Mosmann, R. Stephens, S. Blunt, E.E. Jones, M. Pembrey, Hunter's disease in a girl: association with X:5 chromosomal translocation disrupting the Hunter gene, *Arch. Dis. Child.* 58 (1983) 911-915.
- [18] D.M. Broadhead, J.M. Kirt, A.J. Burt, V. Gupta, P.M. Ellis, G.T. Besley, Full expression of Hunter's disease in a female with an X-chromosome deletion leading to non-random inactivation, *Clin. Genet.* 20 (1986) 392-398.
- [19] J.T. Clarke, W.L. Greer, P.M. Strasberg, R.D. Pearce, M.A. Skomorowski, P.N. Ray, Hunter disease (mucopolysaccharidosis type II) associated with unbalanced inactivation of X chromosomes in a karyotypically normal girl, *Am. J. Hum. Genet.* 49 (1991) 289-297.
- [20] B. Winchester, S. Geddes, S. Genet, J. Hurst, H. Middleton-Price, N. Williams, M. Webb, A. Habel, S. Malcom, Female twin Hunter disease due to nonrandom inactivation of the X-chromosome: a consequence of twinning, *Am. J. Med. Genet.* 44 (1992) 834-838.
- [21] K. Sukegawa, X.Q. Song, M. Masuno, T. Fukao, N. Shimozawa, S. Fukuda, K. Isogai, H. Nishio, M. Matsuo, S. Tomatsu, N. Kondo, T. Orri, Hunter disease in a girl caused by R468Q mutation in the iduronate-2-sulfatase gene and skewed inactivation of the X chromosome carrying the normal allele, *Hum. Mut.* 10 (1997) 316-317.
- [22] K. Sukegawa, T. Matsuzaki, S. Fukuda, M. Masuno, T. Fukao, M. Kokutyu, S. Iwata, S. Tomatsu, T. Orri, N. Kondo, Brother/sister siblings affected with Hunter disease: evidence for skewed X chromosome inactivation, *Clin. Genet.* 53 (1998) 96-101.
- [23] S. Cudry, I. Tigaud, R. Frossairt, V. Bonnet, I. Marie, D. Bozon, MPS II in females: molecular basis of two different cases, *J. Med. Genet.* 37 (2000) e29.
- [24] Y. Doi, G. Toda, K. Yano, Sisters with atypical Fabry's disease with complete atrioventricular block, *Heart.* 89 (2003) e2.
- [25] L.S. Ro, S.T. Chen, L.M. Tang, W.C. Hsu, H.S. Chang, C.C. Haung, Current perception threshold testing in Fabry's disease, *Muscle Nerve* 22 (1999) 1531-1537.
- [26] A.L. Gibas, R. Klatt, J. Johnson, J.T.R. Clarke, J. Katz, Disease rarity carrier status and gender: a triple disadvantage for women with Fabry disease, *J. Genet. Couns.* 17 (2008) 528-537.
- [27] P. B. Deegan, F. Bahner, M-A. Barba Romero, D.A. Hughes, C. Kapmann, M. Beck and on behalf of European FOS Investigators, Natural history of Fabry disease in females in the Fabry outcome survey, *J. Med. Genet.* 43 (2005) 347-352.
- [28] T. Levade, F. Giordano, A. Maret, M.C. Margery, J. Bazex, R. Salvayre, Different phenotypic expression of Fabry disease in female monozygotic twins, *J. Inher. Metab. Dis.* 14 (1991) 105-106
- [29] F. Baenher, C. Kapmann, C. Whybra, E. Miebach, C.M. Wiethoff, M. Beck, Enzyme replacement therapy in heterozygous females with Fabry disease: results of a phase IIIB study, *J. Inher. Metab. Dis.* 26 (2003) 617-627.
- [30] K.D. MacDermont, A. Kolmes, A.H. Miners, Natural history of Fabry disease in affected males and obligate carrier females, *J. Inher. Metab. Dis.* 24 (Suppl 2) (2001) 13-14.

- [31] E.M. Maier, S. Osterrieder, C. Whybra, M. Ries, A. Gal, M. Beck, A.A. Roscher, A.C. Muntau, Disease manifestations and X inactivation in heterozygous females with Fabry disease, *Acta. Paediatr. Suppl.* 34 (2006) 30-38.
- [32] A. Mehta, R. Ricci, U. Widmer, F. Dehout, A. Garcia de Lorenzo, C. Kapmann, A. Linhart, G. Sunder-Plasmann, M. Ries, M. Beck, Fabry disease defined: baseline clinical manifestations of 366 patients in the Fabry Outcome Survey, *Eu. J. Clin. Invest.* 34 (2004) 236-242.
- [33] B.R. Migeon, H.W. Moser, A.B. Moser, J. Axelman, D. Silence, R.A. Norum, Adrenoleukodystrophy: evidence for X linkage, inactivation, and selection favoring the mutant allele in heterozygous cells, *Proc. Natl. Acad.* 78 (1981) 5066-5070.
- [34] E. Watkiss, T. Webb, S. Bunday, Is skewed responsible for symptoms in female carriers for adrenoleukodystrophy? *J. Med. Genet.* 30 (1993) 651-654.
- [35] B.P. O'Neill, H.W. Moser, K.M. saxena, L.C. Marmion, Adrenoleukodystrophy: clinical and biochemical manifestations in carriers, *Neurology* 34 (1984) 798-901.
- [36] E.M. Maier, S. Kammer, A.C. Muntau, M. Whichers, A. Braun, A.A. Roscher, Symptoms in carriers of adrenoleukodystrophy relate to skewed X inactivation, *Ann. Neurol.* 52 (2002) 683-688.
- [37] A.E. Emery, Abnormalities of the electrocardiogram in females carriers of Duchenne muscular dystrophy, *Br. Med. J.* 2 (1969) 418-420.
- [38] P.E. Barkhaus, J.M. Gilchrist, Duchenne muscular dystrophy manifesting carriers, *Arch. Neurol.* 46 (1989) 673-675.
- [39] C.A. Sewry, A. Sansome, A. Clerk, T.G. Sherrat, N. Hasson, E. Rodillo, J.Z. Heckmatt, P.N. Strong, V. Dubowitz, Manifesting carriers of Xp21 muscular dystrophy; lack of correlation between dystrophin expression and clinical weakness, *Neuromuscul. Disord.* 3 (1993) 141-148.
- [40] E.M. Hoogerwaard, E. Bakker, P.F. Ippel, J.C. Oosterwijk, D.F. Majoor-Krakauer, N.J. Leschot, A.J. van Essen, H.G. Brunner, P.A. van der Wouw, A.A. Wilde, M. de Visser, Signs and symptoms of Duchenne muscular dystrophy and Becker muscular dystrophy among carriers in the Netherlands: a cohort study, *Lancet* 353 (1999) 2116-2119.
- [41] R.J. Desnick, Y.A. Ioannou, C.M. Eng. α galactosidase A deficiency: Fabry disease, in Scriver C.R., Beaudet A.L., Sly W.S., Valle D (Eds.), *The metabolic and molecular basis of inherited disease*, MacGraw-Hill, New York, 2001, pp 3773-3774.
- [42] P. Ashton-Prolla, G.A. Ashley, R.F. Pires, R.J. Desnick, C.M. Eng, Fabry disease: comparison of enzymatic, linkage and mutation analysis for carrier detection in a family with a novel mutation (30delG), *A. J. Med. Genet.* 84 (1999) 420-424.
- [43] C. Whybra, I. Willers, J. Davies, B. Whinchester, J. Kriegsmann, K. Bruhl, A. Gal. S. Bunge, M. Beck, Anderson-Fabry disease: clinical manifestations of the disease in female heterozygotes *J. Inherit. Metab. Dis.* 24 (2001) 715-724.
- [44] M. Yoshioka, T. Yorifuri, I. Mituyoshi, Skewed X inactivation in manifesting carriers of Duchenne muscular dystrophy, *Clin. Genet.* 53 (1998) 102-107.
- [45] Y.V. Voznyi, J.L. Keulemans, O.P. van Diggelen, A fluorimetric enzyme assay for the diagnosis of MPS II (Hunter disease), *J. Inherit. Metab. Dis.* 24 (2001) 675-680.

- [46] J.G. de Jong, R.A. Weyers, R. Liebrand-van Sambeek, Measuring urinary glycosaminoglycans in the presence of protein: an improved screening procedure for mucopolysaccharidoses based on dimethylmethylene blue, *Clin. Chem.* 38 (1992) 803-807.
- [47] M. Seabright, A rapid technique for human chromosomes, *Lancet*. 2 (1971) 971-972.
- [48] P.S. Moorhead, P.C. Nowell, W.J. Mellmann, D.M. Battips, D.A. Hungerford, Chromosome preparations of leukocytes cultured from peripheral blood, *Exp. Cell. Res.* 61 (1960) 613-616.
- [49] R.C. Allen, H.Y. Zoghbi, A.B. Moseley, J.W. Belmont, Methylation of *HpaII* and *HhaI* sites near the polymorphic CAG repeat in the human androgen-receptor gene correlates with X chromosome inactivation, *Am. J. Hum. Genet.* 51 (1992) 1220-1239.
- [50] T. Kubota, S. Nonoyama, H. Tonoki, M. Masuno, K. Imaizumi, M. Kojima, K. Wakui, M. Shimadzu, Y. Fukushima, A new assay for the analysis of X-chromosome inactivation based on methylation-specific PCR, *Hum. Genet.* 104 (1999) 49-55.
- [51] L. Vedolin, I.V. Schwartz, M. Komlos, A. Schuch, A.C. Puga, L.L. Pinto, A.P. Pires, R. Giugliani, Correlation of MR imaging and MR spectroscopy findings with cognitive impairment in mucopolysaccharidosis II, *Am. J. Neuroradiol.* 28 (2007) 1029-1033.
- [52] Imaging and processing analysis in JAVA. <http://rsb.info.nih.gov/ij>. Last access in 28 July 2009.
- [53] M. F. Lyon, Gene Action in the X-chromosome of the Mouse (*Mus musculus* L.), *Nature* 190 (1961) 732-737.
- [54] Migeon B, Pappas K, *Females are Mosaics: X inactivation and sex differences in disease*, first ed., Oxford University Press, New York & London, 2007.
- [55] Atul Mehta, Michael Beck, Gere Sunder-Plasmann, *General aspects of X linked diseases in Fabry disease perspectives from 5 years of FOS*, first ed., OXFORD Pharmogenesis, United Kingdom, 2006.
- [56] W.B. Dobyns, A. Filauro, B.N. Tomson, A.S. Chan, A.W. Ho, N.T. Ting, J.C. Osterwijk, C. Ober, Inheritance of most X-linked traits is not dominant or recessive, just X-linked, *Am. J. Med. Genet. A* 129 (2004) 136-143.
- [57] M.C. Lanasa, W.A. Hogge, C. Kibik, J. Blancato, E.P. Hoffman, Highly skewed X-chromosome inactivation is associated with idiopathic recurrent spontaneous abortion, *Am. J. Hum. Genet.* 65 (1999) 252-254.
- [58] R.M. Plenge, R.A. Stevenson, H.A. Lubs, C.E. Schwartz, H.F. Willard, Skewed X-chromosome inactivation is a common feature of X-linked mental retardation disorders *Am. J. Hum. Genet.* 71 (2002) 168-173.

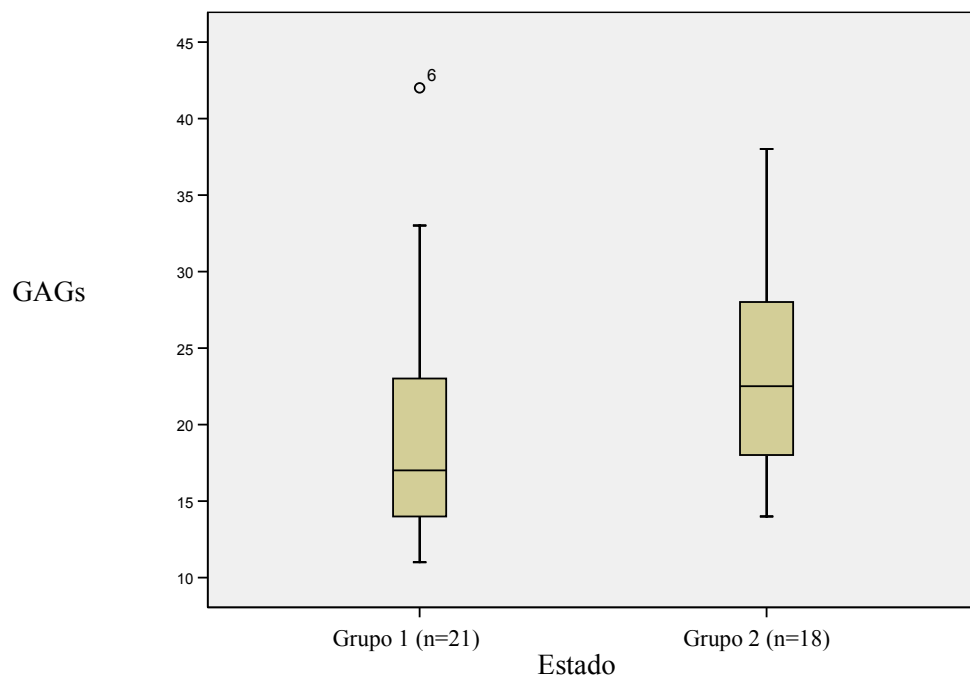


Figura 1. Comparação entre heterozigotas (grupo 1) e não heterozigotas para MPS II em relação aos níveis urinários de GAGs (Valores de referência 13-45mg/mmoL creatinina; p=0,6)

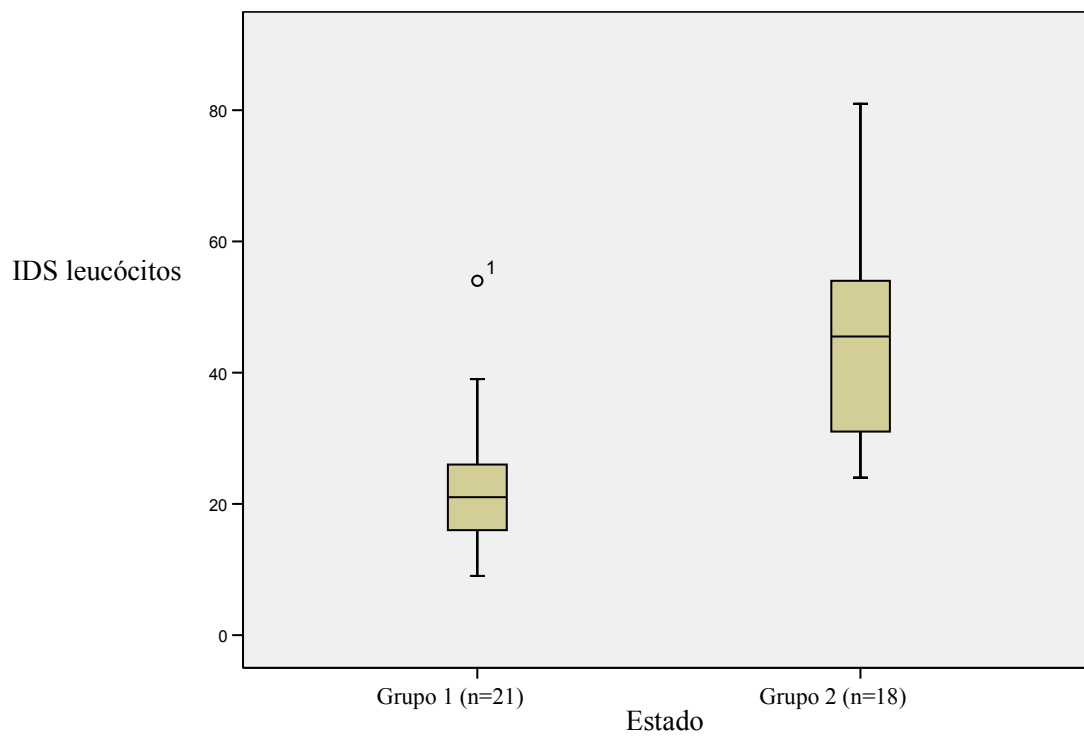


Figura 2. Comparação entre heterozigotas (grupo 1) e não heterozigotas (grupo 2) para MPS II em relação à atividade da IDS em leucócitos (Valores de referência 31-110 nmoles/4h por mg prot; $p < 0,001$)

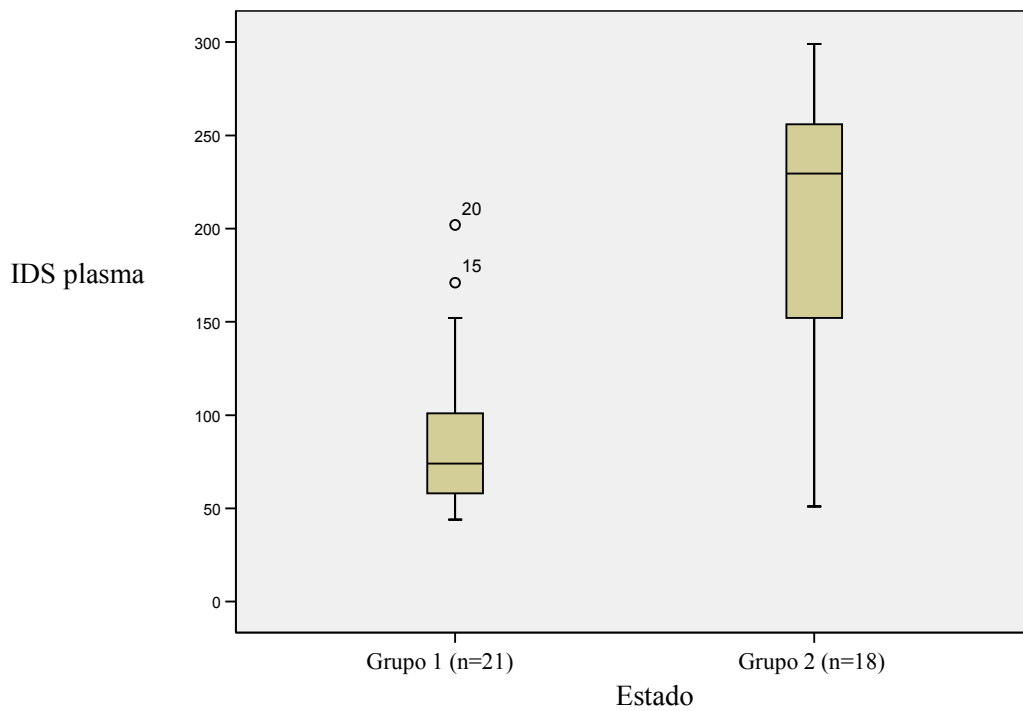


Figura 3. Comparação entre heterozigotas (grupo 1) e não heterozigotas (grupo 2) para MPS II em relação à atividade de IDS em plasma (Valores de referência 122-463 nmoles/4h por mL; $p < 0,001$)

Quadro 1. Comparação entre heterozigotas e não heterozigotas para MPS II: idade, estatura, peso, perímetro cefálico e menarca

	Heterozigotas (n=22)	Não heterozigotas (n=18)	p-valor
Idade (anos)			
Mediana	35	38,5	0,7
IQ ¹	32,7-40,7	22,2-49,2	
Variação	22-55	15-75	
Estatura (cm)			
Mediana	159,5	160,5	0,6
IQ ¹	155,5-163,2	156,7-163	
Variação	148-172	153-170	
Peso (kg)			
Mediana	60,5	60,5	0,9
IQ ¹	55,5-71,2	54,7-73	
Variação	48-119	47-82	
Perímetro cefálico (cm)			
Mediana	55	54	0,9
IQ ¹	53-57	53-55	
Variação	52-58	52-57	
Menarca (anos)			
Mediana	12	11	0,3
IQ ¹	11-13,2	12-14	
Variação	9-15	11-14	

¹ IQ Intervalo interquartil 25-75

Quadro 2. Resultados de imagem nas heterozigotas e não heterozigotas para MPS II

	Heterozigotas (n=22)	Não heterozigotas (n=18)	p-valor
Volume hepático normalizado ¹ (%)			
n	14	16	
Mediana	14,6	15,4	0,3
IQ ²	12,1-16,2	13,2-16,2	
Variação	10-18,5	10,8-19,2	
Volume hepático (cm ³)			
n	17	17	
Mediana	1605,9	1498,1	0,3
IQ ²	1377,9-1701,3	1232,6-1682,6	
Variação	858,5-2892,2	822,1-2200,8	
Volume esplênico normalizado ³ (%)			
n	14	16	
Mediana	2	1,5	0,03*
IQ ²	1,7-2,5	1,2-2,2	
Variação	1,3-3,9	0,6-3,2	
Volume esplênico (cm ³)			
n	12	16	
Mediana	190,8	137,1	0,1
IQ ²	126,6-262,8	114,2-205,3	
Variação	56,3-421	87,1-257,2	
Volume cerebral normalizado ⁴ (%)			
n	7	15	
Mediana	46,5	46,7	0,5
IQ ²	42,4-48,7	44,1-49,1	
Variação	41,7-49	41,9-51,8	
Lesões cerebrais ⁵ (%)			
n	7	15	
Mediana	0,1	0,1	0,5
IQ ²	0,1-0,3	0-0,2	
Variação	0-0,7	0-1	
Volume ventricular normalizado ⁶ (%)			
n	7	15	
Mediana	0,6	0,3	0,1
IQ ²	0,4-0,6	0,2-0,6	
Variação	0,3-1,1	0,1-1,2	

¹Volume hepático normalizado: volume hepático (voxels)/volume abdominal (voxels)

²IQ: Intervalo interquartil

³Volume esplênico normalizado = volume esplênico (voxels)/volume abdominal (voxels);

⁴Volume cerebral normalizado = volume cerebral (voxels)/ volume cerebral total (voxels);

⁵Lesões cerebrais= lesões (voxels)/ volume cerebral total (voxels);

⁶Volume ventricular normalizado = volume ventricular (voxels)/volume craniano cerebral (voxels);

* Aplicada a correção de Bonferroni o valor de p não foi estatisticamente significativo.

9 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O número estimado de mulheres a serem incluídas na amostra foi de 50, levando-se em consideração o número de pacientes com MPS II acompanhados no ambulatório de MPS do SGM-HCPA, quando do planejamento do estudo. Foram incluídos no estudo um total de 49 mulheres, número que consideramos significativo, tendo em vista que esse é o primeiro estudo que avaliou, com estudos radiológicos e o estudo do padrão de inativação do cromossomo X, heterozigotas assintomáticas para MPS II. Dessas 49 mulheres, 9 foram excluídas pelo fato da mutação não ter sido identificada no caso índice até o momento da redação dessa tese ou pelo estado de heterozigota não ter sido confirmado pela história familiar. Foi possível classificar as 40 mulheres sendo 22 heterozigotas e as 18 restantes em não heterozigotas. Devido ao fato de ser uma doença rara, a amostragem foi por conveniência e não foi realizado cálculo do tamanho amostral, sendo que ao todo foram estudadas 24 famílias.

Em relação ao recrutamento da amostra, tivemos um viés amostral, pois foi incluída uma família com 12 mulheres a qual, após a realização da análise molecular, somente uma familiar identificada como sendo heterozigota. Dessa forma, talvez os resultados da inativação do cromossomo X apresentassem maior validade externa caso tivessem sido estudados em não heterozigotas provenientes de um número maior de famílias, sugestão que fica para um próximo estudo.

Ainda em relação ao estudo da inativação do cromossomo X, somente 25 mulheres foram informativas (10 heterozigotas e 15 não heterozigotas); por outro lado, a presença de

homozigose foi encontrada em 6 mulheres (4 heterozigotas e 2 não heterozigotas) e a presença de desvio da inativação do cromossomo X foi observado em 11 mulheres (2 heterozigotas e 9 não heterozigotas). De acordo com esses resultados 24% (n= 6/25) das mulheres não eram informativas, número maior do que o descrito na literatura que está ao redor de 8 a 10% (AMOS-LANDGRAF *et al.*, 2006; ALLEN *et al.*, 1994). Esse achado pode ser ter sido decorrente do tamanho amostral pequeno e adicionalmente ao fato da não obtenção de alguns resultados por problemas técnicos ocorridos durante o ensaio do HUMARA. A aparente maior frequência da presença de um maior desvio da inativação do cromossomo X em não heterozigotas foi observada na mesma família em 8/12 mulheres, sugerindo a existência de um padrão herdável do desvio da inativação do cromossomo X já relatado na literatura (ORSTAVIK *et al.*, 1996; NAUMOVA *et al.*, 1998; SULLIVAN *et al.*, 2003). Infelizmente, uma correlação clínica com esse achado molecular não foi possível de ser obtida nesse estudo

Como este estudo foi realizado em colaboração com vários laboratórios e pesquisadores, dificuldades técnicas ocorreram e, algumas vezes, não foi possível a realização de todos os exames em todos os indivíduos incluídos. Por exemplo, nem todas as mulheres que aceitaram participar do estudo conseguiram realizar os exames radiológicos, seja porque uma das pacientes sofria de “claustrofobia”, ou por motivos técnicos como o fato de o aparelho para realização da tomografia computadorizada abdominal ter ficado em manutenção por um longo período durante o estudo. Uma dificuldade na realização dos exames residiu no fato de que mais de 50% das mulheres não moravam em Porto Alegre de modo que a consulta e os exames eram agendados todos numa só visita não podendo ser repetidos.

As mulheres que participaram desse estudo serão chamadas para uma consulta de aconselhamento genético na qual receberão os resultados das avaliações em um relatório por extenso. Para as heterozigotas, que desejarem, será oferecida a opção de realizar diagnóstico pré-natal quando engravidarem.

Os dados adicionais coletados nesse estudo estão sumarizados nos anexos da tese.

10 CONCLUSÕES

OBJETIVO GERAL

Avaliar a presença de sinais e sintomas possivelmente relacionados à heterozigose para MPS II, contribuindo para estimar o impacto desta condição nessas mulheres através da identificação de marcadores sensíveis e específicos.

As heterozigotas para MPS II não parecem apresentar sinais e sintomas relacionados à doença. Os únicos marcadores, dos que foram avaliados, que demonstraram alterações foram as atividades mais baixas da IDS tanto em leucócitos como em plasma nas heterozigotas quando comparadas às não heterozigotas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar a frequência de alterações no cromossomo X nas heterozigotas para MPS II.

A frequência de alterações no cariótipo de sangue periférico nas heterozigotas para MPS II sem sintomas clínicos foi ausente.

Avaliar o padrão de inativação do cromossomo X nas heterozigotas para a MPS II

As heterozigotas para MPS II não apresentaram diferença estatisticamente

significativa do padrão inativação do cromossomo X quando comparadas às não heterozigotas, na maioria dos casos apresentando a forma randômica da inativação do cromossomo X.

Avaliar a presença de marcadores bioquímicos sensíveis e específicos potencialmente relacionados com a heterozigose para MPS II.

A atividade da IDS foi significativamente mais baixa nas heterozigotas para MPS II tanto em plasma quanto em leucócitos, quando comparadas às não heterozigotas. No entanto não foram calculadas a especificidade e a sensibilidade da atividade enzimática da IDS para a identificação nas heterozigotas, cujo método padrão-ouro é a análise molecular.

Avaliar a ocorrência de possíveis marcadores de imagem nas heterozigotas para a MPS II.

As heterozigotas não parecem apresentar sinais radiológicos relacionados à MPS II.

Avaliar a possível ocorrência de uma maior frequência de abortamentos espontâneos na prole de heterozigotas para MPS II.

As heterozigotas para MPS II não apresentam um maior frequência de abortamentos espontâneos quando comparadas com as não heterozigotas para MPS II.

Os resultados deste trabalho, o primeiro estudo sistemático publicado na literatura

sobre manifestações de MPS II nas heterozigotas, indicam que essa condição parece apresentar baixa penetrância nas heterozigotas e dessa maneira essas mulheres podem ser tranqüilizadas quanto a sua saúde, em relação ao risco de virem a apresentar sintomas relacionados à MPS II.

11 REFERÊNCIAS

1. Abkowitz JL, Catlin SN, Gutter P. Evidence that hematopoiesis may be a stochastic process in vivo. *Nat Med*. 1996;2(2):190-7.
2. Adinolfi M. Hunter syndrome: cloning of the gene, mutations and carriers detection. *Dev Med Neurol*. 1993;35(1):79-85.
3. Allen RC, Zoghbi HY, Moseley AB, Rosenblatt HM, Belmont JW. Methylation of *HpaII* and *HhaI* sites near the polymorphic CAG repeat in the human androgen-receptor gene correlates with X chromosome inactivation. *Am J Hum Genet*. 1992;51(6):1229-39.
4. Allen RC, Nachtam RG, Rosenblatt HM, Belmont JW. Application of carrier testing to genetic counseling for X-linked Agamaglobulinemia. *Am J Hum Genet*. 1994;54(1):25-35.
5. Alterman LA, de Alwis M, Genet S, Lovering R, Middleton-Price H, Morgan G, et al. Carrier determination for X-linked agamaglobulinemia using X-inactivation analysis of purified B cells. *J Immunol Methods*. 1993;166(1):111-6.
6. Amos-Landgraf JM, Cottle A, Plenge RM, Friez M, Schwartz CE, Longshore J, et al. X chromosome-inactivation patterns of 1,005 phenotypically unaffected females. *Am J Hum Genet*. 2006;79(3):493-9.
7. Applegarth DA, Tonne JR, Lowry RB. Incidence of inborn errors of metabolism in British Columbia, 1969-1996. *Pediatrics*. 2000;105(1):e10.
8. Archer IM, Harper PS, Wusteman FS. An improved assay for iduronate 2-sulphate in serum and its use in the detection of carriers of the Hunter syndrome. *Clin Chim Acta*. 1981;112(1):107-12.
9. Archer IM, Rees DW, Oladimeji A, Wusteman FS, Harper PS. Detection of female carriers of Hunter's syndrome: comparison of serum and hair-root analysis. *J Inher Metabol Dis*. 1982;5:15-6.
10. Archer, IM, Young ID, Rees DW, Oladimeji A, Wusteman FS, Harper PS. Carrier detection in Hunter syndrome. *Am J Med Genet*. 1983;16(1):61-9.
11. Archer H, Evans J, Leonard H, Colvin L, Ravine D, Christdodoulou J, et al. Correlation between clinical severity in patients with Rett syndrome with a p. R168X or p.T158M MECP2 mutation, and the direction and degree of skewing of X-chromosome inactivation. *J Med Genet*. 2007;44(2):148-52.

12. Avner P, Heard E. X-chromosome inactivation: counting, choice and initiation. *Nat Rev Genet.* 2001;2(1):59-67.
13. Amos-Landgraf, JM, Cottle, A, Plenge RM, Friez M, Schwartz CE, Longshore J, et al. X-chromosome inactivation patterns of 1005 phenotypically unaffected females. *Am J Med Gen.* 2006;79(3):493-9.
14. Baenher F, Schmiedeskamp C, Krummenauer F, Miebach E, Bajbouj M, Whybra C et al. Cumulative incidence rates of the mucopolysaccharidoses in Germany. *J Inherit Metab Dis.* 2005;28(6):1011-7.
15. Bagislar S, Ustuner I, Cengiz B, Soylemez F, Akyerli CB, Ceylaner S, et al. Extremely skewed X-chromosome inactivation patterns in women with recurrent spontaneous abortion. *Aust N Z J Obstet Gynaecol.* 2006;46(5):384-7.
16. Ballabio A, Gieselmann V. Lysosomal disorders: from storage to cellular damage. *Biochim Biophys Acta.* 2008;1793(4):684-96.
17. Beard C, Li E, Jaenisch R. Loss of methylation activates Xist in somatic but not in embryonic cells. *Genes Dev.* 1995;9(19):2325-34.
18. Beever CL, Stephenson MD, Peñaherrera MS, Jiang RH, Kalousek DK, Hayden M, et al. Skewed X-chromosome inactivation is associated with trisomy in women ascertained on the basis of recurrent spontaneous abortion or chromosomally abnormal pregnancies. *Am J Hum Genet.* 2003;72(2):399-407.
19. Belmont, JW. Genetic control of X inactivation and process leading to X inactivation skewing. *Am J Hum Genet.* 1996;58(6):1101-8.
20. Bennet RL, Hart KA, O'Rourke E, Barranger JA, Johnson J, MacDermont KD, et al. Fabry disease in genetic counseling practice: recommendations of the National Society of Genetic Counselors. *J Genet Couns.* 2002;11(2):121-46.
21. Bergstrom SK, Quinn JJ, Greenstein R, Ascensao J. Long-term follow-up of a patient transplanted for Hunter's disease type IIB; a case report and literature review. *Bone Marrow Transplant.* 1994;14(4):653-8.
22. Berry-Kravis E, Potanos K, Weinberg D, Zhou L, Goetz CG. Fragile X-associated tremor/ataxia syndrome in sister related to X inactivation. *Ann Neurol* 2005;57(1):144-7.
23. Beutler E, Yeh M, Fairbanks VF. The normal human female as a mosaic of X chromosome activity: studies using the gene for G6PD deficiency as a marker. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1962;48:9-16.

24. Biccocchi MP, Migeon BR, Pasino M, Lanza T, Bottini F, Boeri E, et al. Familial nonrandom inactivation linked to the X inactivation centre in heterozygotes manifesting haemophilia A. *Eur J Hum Genet.* 2005;13(5):635-40.
25. Bittel DC, Theodoro MF, Kibirveva N, Fischer W, Talebizadeh Z, Butler MG. Comparison of X-chromosome inactivation patterns in multiple tissues from human females. *J Med Genet.* 2008;45(5):309-13.
26. Bolduc V, Chagnon P, Provost S, Dubé MP, Belisle C, Gingras M, et al. No evidence that skewing of X chromosome inactivation patterns is transmitted to offspring humans. *J Clin Invest.* 2008;118(1):333-41.
27. Booth CW, Nadler HL. Demonstration of the heterozygous state in Hunter's syndrome. *Pediatrics.* 1974;53(3):369-9.
28. Borry P, Fryns JP, Schotsmans P, Dierickx K. Carrier testing in minors: a systematic review of guidelines and positions papers. *Eur J Hum Genet.* 2006;14:133-8.
29. Borsani G, Tonlorenzi R, Simmler MC, Dandolo L, Arnaud D, Capra V, et al. Characterization of a murine gene expressed from the inactive X chromosome. *Nature.* 1991;351(6234):325-9.
30. Bond CS, Clements PR, Ashby S, Collyer CA, Harrop SJ, Hopwood JJ, et al. Structure of human lysosomal sulfatase. *Structure.* 1997;5(2):277-89.
31. Boumil RM, Lee JT. Forty years of decoding the silence in X-chromosome inactivation. *Hum Mol Genet.* 200;10(2):2225-32.
32. Broadhead DM, Kirk JM, Burt AJ, Gupta V, Ellis PM, Besley GT. Full expression of Hunter's disease in a female with an X-chromosome deletion leading to non-random inactivation. *Clin Genet.* 1986;30(5):392-8.
33. Brockdorff N, Ashworth A, Kay GF, Cooper P, Smith S, McCabe VM, et al. Conservation of position and exclusive expression of mouse Xist from the inactive X chromosome. *Nature.* 1991;351(6324):329-31.
34. Brockdorff N, Ashworth A, Kay GF, McCabe VM, Norris DP, Cooper PJ, et al. The product of the mouse Xist gene is a 15kb inactive X-specific transcript containing no conserved ORF and located in the nucleus. *Cell.* 1992;71(3):515-26.
35. Brockdorff N, Turner BM. Dosage compensation in mammals. In: Allis CD, Jenuwien T, Reinberg D, eds. *Epigenetics.* New York: Cold Springs Harbor Laboratory Press; 2007. p.321-40.

36. Brown CJ, Ballabio A, Rupert JL, Lafeniere RG, Grompe M, Tonlorenzi R A, et al. A gene from the region of the human X inactivation centre is expressed exclusively from the inactive X chromosome. *Nature*. 1991;349(6304):38-44.
37. Brown CJ, Hendrich BD, Rupert JL, Lafeniere RG, Xing Y, Lawrence J, et al. The human XIST gene: analysis of a 17kb inactive X-specific RNA that contains conserved repeats and is highly localized within the nucleus. *Cell*. 1992;71(3):527-42.
38. Brown CJ, Willard HF. The human X inactivation center is not required for maintenance of X inactivation. *Nature*. 1994;368:154-6.
39. Brown CJ, Robinson WP. The causes and consequences of random and non-random X chromosome inactivation in humans. *Clin Genet*. 2000;58(5):353-63.
40. Buller RE, Sood AK, Lallas T, Buekers T, Skilling JS. Association between nonrandom X-chromosome inactivation and BRCA1 mutation in germline DNA of patients with ovarian cancer. *J Natl Cancer Inst*. 1999;91(4):339-46.
41. Busque L, Mio R, Mattioli J, Brais E, Blais N, Lalonde Y, et al. Nonrandom X-inactivation patterns in normal females: lyonization ratios vary with age. *Blood*. 1996;88(1):59-65.
42. Butler MG, Theodoro MF, Bittel DC, Kuipers PJ, Driscoll DJ, Talebizadeh Z, et al. X-chromosome inactivation patterns in females with Prader-Willi syndrome. *Am J Med Genet. A* 2007;143(5):469-75.
43. Capobianchi MR, Romeo G. Mosaicism for sulfiduronate sulfatase deficiency in carriers of Hunter's syndrome. *Experientia*. 1976;32(4):459-6.
44. Cardone M, Polito VA, Pepe S, Mann L, D'Azzo A, Auricchio A, et al. Correction of Hunter syndrome in the MPS II mouse model by AAV2/8-mediated gene delivery. *Hum Mol Genet*. 2006;15(7):1225-36.
45. Carrel L, Willard HF. X-inactivation profile reveals extensive variability in X-linked gene expression in females. *Nature*. 2005;434(7031):400-4.
46. Cattanach BM, Isaacson JH. Controlling elements in the mouse X chromosome. *Genetics*. 1967;57(2):331-46.
47. Carrington B, Sacks G, Regan L. Recurrent miscarriage: pathophysiology and outcome. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2005;17(6):591-7.
48. Chadwick LH, Pertz LM, Broman KW, Bartolomei MS, Willard HF, et al. Genetic control of X chromosome inactivation in mice: definition of the Xce candidate interval. *Genetics*. 2006;173(4):2103-10.

49. Chang, JH, Lin SP, Lin SC, Tseng KL, Li CL, Chuang CK, et al. Expression studies of mutations underlying Taiwanese Hunter syndrome (mucopolysaccharidosis type II). *Hum Genet.* 2005;116(3):130-6.
50. Chakravarti A, Bale SJ. Differences in the frequency of X-linked deleterious genes in human populations. *Am J Hum Genet.* 1983;35(6):1257-7.
51. Champion KM, Gilbert JG, Asimakopoulos FA, Hinshelwood S, Green AR. Clonal haemopoiesis in normal elderly women implications for the myeloproliferative disorders and myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol.* 1997;97(4):920-6.
52. Chao W, Huynh KD, Spencer RJ, Spencer RJ, Davidow LS, Lee JT, et al. CTCF, a candidate trans-acting factor for X-inactivation choice. *Science.* 2002;295(5553):345-7.
53. Chase DS, Morris AH, Ballabio A, Pepper S, Giannelli F, Adinolfi M, et al. Genetics of Hunter syndrome: carrier detection, new mutations, segregation and linkage analysis. *Ann Hum Genet.* 1986;50(Pt4):349-60.
54. Chen GL, Prchal JT. X-linked clonality testing: interpretation and limitations. *Blood.* 2007;110(5):1411-9.
55. Christensen K, Kristiansen M, Hagen-Larsen H, Skythe A, Bathum L, Jeune B, et al. X linked genetic factors regulate hematopoietic stem-cell kinetics in females. *Blood.* 2007;95(7):2449-51.
56. Chuva de Souza Lopes SM, Hayashi K, Shovlin TC, Mifsud W, Surani MA, McLaren A. X chromosome activity in mouse XX primordial germ cells. *PLOS.* 2008;4(2):e30.
57. Clarke JT, Greer WL, Strasberg PM, Pearce RD, Skomorowski MA, Ray PN. Hunter disease (mucopolysaccharidosis type II) associated with unbalanced inactivation of X chromosomes in a karyotypically normal girl. *Am J Hum Genet.* 1991;49(2):289-97.
58. Clarke JTR, Wilson PJ, Morris CP, Hopwood JJ, Richards RI, Sutherland GR, et al. Reply to Migeon. *Am J Hum Genet.* 1993;52(2):433-34.
59. Clarke A. The genetic testing of children. Working Party of the Clinical Genetics Society (UK). *J Med Genet.* 1994;31(10):785-97.
60. Clerc P, Avner P. Role of the region 3' to Xist exon 6 in the counting process of X-chromosome inactivation. *Nat Genet.* 1998;19(3):249-53.
61. Clifford K, Rai R, Regan L. Future pregnancy outcome in unexplained recurrent first trimester miscarriage. *Hum Reprod.* 1997;12(2):387-9.

62. Cohen DE, Davidow LS, Erwin JA, Xu N, Warshawsky D, Lee JT. The DXPas34 repeat regulates random and imprinted X inactivation. *Dev Cell*. 2007;12(1):57-71.
63. Copa GV, Gabrielli O, Zampini L, Pierani P, Giorgi PL, Jezequel AM et al. Bone marrow transplantation in Hunter syndrome (mucopolysaccharidosis type II): two-year follow-up of the first Italian patient and review of the literature. *Pediatr Med Chir*. 1995;17(3):227-35.
64. Courtier B, Heard E, Avner P. Xce haplotypes show modified in a region of the active X chromosome lying 3' to Xist. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995;92(8):3531-5.
65. Cuddapah S, Jothi R, Schones DE, Roh TY, Cui K, Zhao K. Global analysis of the insulator binding protein CTCF in chromatin barrier regions reveals demarcation of active and repressive domains. *Genome Res*. 2009;19(1):24-32.
66. Cudry S, Tigaud I, Froissart R, Bonnet V, Maire I, Boson D MPS II in females: molecular basis of two different cases. *J Med Genet*. 2000;37(10):e29.
67. Csankovski G, Panning B, Bates B, Pehrson JR, Jaenisch R. Conditional deletion of Xist disrupts histone macroH2A localization but not maintenance of X inactivation. *Nat Genet*. 1999;22(4):323-4.
68. Cszankovski G, Nagy A, Jaenisch R. Synergism of Xist RNA, DNA methylation, and histone hypoacetylation in maintaining X chromosome inactivation. *J Cell Biol*. 2001;153(4):773-84.
69. Danes BS, Bearn AG. Hurler's syndrome: a genetic study of clones in cell culture with particular reference to the Lyon hypothesis. *J Exp Med*. 1967;126(3):509-22.
70. Daniels R, Zucotti M, Kinis T, Serhal P, Monk M. XIST expression in humans oocytes and preimplantation embryos. *Am J Hum Genet*. 1997;61(1):33-9.
71. Davidson RG, Nitowsky HM, Childs B. Demonstration of two populations of cells in the human female heterozygous for glucose-6-phosphate dehydrogenase variants. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1963; 50:481-5
72. Dean MF. The iduronate sulphatase activities of cells and tissue fluids from patients with Hunter syndrome and normal controls. *J Inherited Metab Dis*. 1983;6(3):108-11.
73. Debrand E, Chureau C, Arnaud D, Abner P, Heard E. Functional analysis of the DXPas34 locus 3' regulator of Xist expression. *Mol Cell Biol*. 1999;19(12):8513-25.
74. de Jong JG, Weyers RA, Liebrand-van Sambeek R. Measuring urinary glycosaminoglycans in the presence of protein: an improved screening procedure for mucopolysaccharidoses based on dimethylmethylene blue. *Clin Chem*. 1992;38(6):803-7.

75. Desnick RJ, Ioannou YA, Eng CM. α galactosidase A deficiency: Fabry disease. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, editores. The metabolic and molecular basis of inherited disease. New York: MacGraw-Hill; 2001. p.3773-74.
76. Demistru T, Kakurati M, Okutubo Y, Shibayama C, Kikuchi Y, Mori Y, et al. Skin eruption as the presenting sign of Hunter syndrome IIB. *Clin Exp Dermatol.* 1999;24:179-82.
77. Diaz-Perez S, Ouyang Y, Perez V, Cisneros R, Regelson M, Marahrens Y. The element(s) at the nontranscribed Xist locus of the active X chromosome controls chromosomal timing in the mouse. *Genetics.* 2005;171(2):663-72.
78. Disteche CM. Escape from X inactivation in human and mouse. *Trends Genet.* 1995;11(1):17-22.
79. Dobyns WB, Filauro A, Tomson BN, Chan AS, Ho AW, Ting NT, Osterwijk JC, Ober C. Inheritance of most X-linked traits is not dominant or recessive, just X-linked. *Am J Med Genet.* 2004; 129A:136-43.
80. Donnelly PV, Di Ferrante N. Reliability of the Booth-Nadler technique of Hunter heterozygotes. *Pediatrics.* 1975;56(3):429-33.
81. El Kassar N, Hetet G, Brière J, Grandchamp B. X-chromosome inactivation in healthy females: incidence of excessive lyonization with age and comparison of assays involving DNA methylation and transcript polymorphisms. *Clin Chem.* 1998;44(1):61-7.
82. Fearon ER, Kohn DB, Winkelstein JA. Carrier detection in the Wiskott Aldrich syndrome. *Blood.* 1988;72(5):1735-9.
83. Fey MF, Liechti-Gallati S, von Rohr, A, Borisch B, Theiklas L, Schneider V, et al. Clonality and X inactivation patterns in hematopoietic cell populations detected by highly informative M27 beta DNA probe. *Blood.* 1994;83(4):931-8.
84. Filosa S, Giacometi N, Wangwei C, De Mattia D, Pagnini D, Alfinito F, et al. Somatic-cell selection is a major determinant of the blood-cell phenotype in heterozygotes for glucose-6-phosphate dehydrogenase mutations causing severe enzyme deficiency. *Am J Hum Genet.* 1996;59(4):887-95.
85. Fraga MF, Ballestar E, Paz MF, Ropero S, Setien F, Ballestar ML, et al. Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005;102(30):10604-9.
86. Friso A, Tomanin R, Alba S, Gasparotto N, Puicher EP, Fusco M, et al. Reduction of GAG storage in MPS II mouse model following implantation of encapsulates recombinant myoblasts. *J Gene Med.* 2005;7(11):1482-91.

87. Frommer M, Mc Donald LE, Millar DS, Collis CM, Watt F, Grigg GW, et al. A genomic sequencing protocol that yield a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992;89(5):1827-31.
88. Froissart R, Maire I, Millat G, Cudry S, Birot AM, Bonnet V, et al. Identification of iduronate sulfatase gene alteration in 70 unrelated Hunter patients. *Clin Genet*. 1998;53:362-8.
89. Frossairt R, Maire I, Bonnet V, Levade T, Bozon D. Germline and somatic mosaicism in a female carrier of Hunter disease. *J Med Genet*. 1997;2(5):137-40.
90. Fryer A. Inappropriate genetic testing of children. *Arch Dis Child*. 2000;83(4):283-5.
91. Gale RE, Fielding AK, Harrison CN, Linch DC. Acquired skewing of X-chromosome inactivation patterns in myeloid cells of the elderly suggests stochastic clonal loss with age. *Br J Haematol*. 1997;98(3):512-9.
92. Gartler SM, Riggs AD. Mammalian X-chromosome Inactivation. *Annu Rev Genet*. 1983;17:155-90.
93. Gieselmann V. Lysosomal storage diseases. *Biochim Biophys Acta*. 1995;1270(2-3):103-36.
94. Gieselmann V, Ballabio A. Lysosomal disorders: from storage to cellular damage *Biochim Biophys Acta*. 2009;1793(4):684-96.
95. Goto T, Wright E, Monk M. Paternal X-chromosome inactivation in human trophoblastic cells. *Mol Hum Reprod*. 1997;3(1):77-80.
96. Goto T, Monk M. Regulation of X-chromosome inactivation in development in mice and humans. *Microbiol Mol Biol Rev*. 1998;62(2):362-78.
97. Greenwold N, Jauniaux E. Collection of villous tissue under ultrasound guidance to improve the cytogenetic study of early pregnancy failure. *Hum Reprod*. 2002;17(2):452-6.
98. Haldane JB. The rate of spontaneous mutation of a human gene. 1935. *J Genet*. 2005;83(3):235-44.
99. Harris A, Collins J, Vetrie D, Cole C, Bobrow M. X inactivation as a mechanism of selection against lethal alleles: further investigation of incontinentia pigmenti and X linked lymphoproliferative disease. *Med Genet*. 1992;29(9):608-14.
100. Harrison KB, Warburton D. Preferential X-chromosome activity in human female placental tissues. *Cytogenet Cell Genet*. 1986;41:163-8.
101. Harrison KB. X-chromosome inactivation in the human cytotrophoblast. *Cytogenet Cell Genet*. 1989;5(3):37-41.

- 102.Hatakeyama C, Anderson CL, Beever CL, Penaherrera MS, Brown CJ, Robinson WP. The dynamics of X inactivation skewing as women age. *Clin Genet.* 2004;66(1-2):327-32.
- 103.Heard E, Mongelar F, Arnaud D, Avner P. Xist yeast artificial chromosome transgenes function as X-inactivation centers only in multicopy arrays and not as single copies. *Mol Cell Biol.* 1999;19(4):3156-66.
104. Heard E. Delving into the diversity of facultative heterochromatin: the epigenetics of the inactive X chromosome. *Curr Opin Genet Dev.* 2005;15(5):482-9.
- 105.Heard E, Disteche CM. Dosage compensation in mammals: fine tuning the expression of the X chromosome. *Genes Dev.* 2006;20(14):1848-67.
- 106.Heffner LJ. Advanced maternal age—how is too old? *N Engl J Med.* 2004;351(19):1927-9.
- 107.Hendrich BD, Plenge RM, Willard HF. Identification and characterization of the human XIST gene promoter: implications for models of X chromosome inactivation. *Nucleic Acid Res.* 1997;25(13):2661-71.
- 108.Herdera P, Gorskij L. Oculo-facio-cardio-dental syndrome: skewed X chromosome inactivation in mother and daughter suggested X linked dominant inheritance. *Am J Med Genet.* 2003;123A(3):261-6.
- 109.Herman JG, Graff JR, Myohanen S, Nelkin BD, Baylin SB. Methylation-specific PCR: a novel assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996;93(18):9821-6.
- 110.Herzing LB, Romer JT, Horn JM, Ashworth A. A Xist has properties of the X-chromosome inactivation center. *Nature.* 1997;386(6622):272-75.
- 111.HGMD[®] Cardiff [Internet]. Cardiff: The Human Gene Mutation Database at the Institute of Medical Genetics of Cardiff, Inc; [updated 2008; cited Jul 2009] Available from: <http://www.hgmd.cf.ac.uk/>
- 112.Hogge WA, Prosen TL, Lanasa MC, Huber HA, Reeves MF. Recurrent spontaneous abortion and skewed X inactivation: is there an association? *Am J Obstet Gynecol.* 2007;196(4):e1-6.
- 113.Jones AS, Almássy Z, Beck M, Burt K, Clarke JT, Giugliani R, et al. Mortality and cause of death in mucopolysaccharidosis type II-a historical review based on data from the Hunter Outcome Survey (HOS). *J Inherit Metab Dis.* Epub 2009 Jul 14.

114. Kaare M., Painter JN, Ullander VM, Kaaja R, Aittomaki K. Sex chromosome characteristics and recurrent miscarriage. *Fertil Steril*. 2008;90(6):2328-33.
115. Kay GF, Penny GD, Patel D, Ashworth A, Brochdorff N, Rastan S. Expression of Xist during mouse development suggests a role in the initiation of X chromosome inactivation. *Cell*. 1993;72(2):171-82.
116. Keller P, Tremml G, Rosti V, Bessler M. X inactivation and somatic cell selection rescue female mice carrying a Piga-null mutation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999;96(13):7479-83.
117. Keulemans JLM, Sinigerska I, Garritsen VH, Huijmans JGM, Voznyi YV, van Diggelen OP, et al. Prenatal diagnosis of Hunter syndrome and the introduction of a new fluorimetric enzyme assay. *Prenatal diagnosis*. 2002;22(11):1016-21.
118. Kim CH, Hwang HZ, Seng MS, Palik KH, Kwon EK, Moon KB, et al. Mutational spectrum of the iduronate sulfatase gene in 25 unrelated Korean Hunter syndrome patients: identification of 13 novel mutations. *Hum Mut*. 2003; 21:449-50.
119. Kim JW, Park SY, Kim YM, Han JY, Ryu HM. X-chromosome inactivation patterns in Korean women with idiopathic recurrent spontaneous abortion *J Korean Med Sci*. 2004;19(4):258-62.
120. Kline J, Kinney A, Levin B, Warburton D. Trisomic pregnancy and earlier age at menopause. *Am J Hum Genet*. 2000;67(2):395-404.
121. Knoel KA, Tunnesten WWJr. Picture of the month. Hunter syndrome (mucopolysaccharidosis IIA). *Arch Pediatric Adolesc Med*. 2000;154(1):85-6.
122. Kristiansen M, Knudsen GP, Bathum L, Naumova AK, Sorensen TI, Naumova AK, et al. Twin study of genetic and aging effects on X chromosome inactivation. *Eur J Hum Genet*. 2005;13(5):599-606.
123. Kubota T, Nonoyama S, Tonoki H, Masuno M, Imaizumi, Kojima M, et al. A new assay for the analysis of X-chromosome inactivation based on methylation-specific PCR. *Hum Genet*. 1999;104(1):49-55.
124. Kuo PL, Huang SC, Chang LW, Lin CH, Tsai WH, Teng YN. Association of extremely skewed X-chromosome inactivation with Taiwanese women presenting with pregnancy loss. *J Formos Med Assoc*. 2008;107(4):340-3.
125. Lake BD, Young EP, Winchester BG. Prenatal diagnosis of lysosomal storage diseases. *Brain Pathol*. 1998;8(1):133-49.
126. Lanasa MC, Hogge WA, Kibik C, Blancato J, Hoffman EP. Highly skewed X-chromosome inactivation is associated with idiopathic recurrent spontaneous abortion. *Am J Hum Genet*. 1999a;65(1):252-4.

- 127.Lanasa MC, Hogge WA, Hoffman EP. Sex chromosome genetics'99. The X chromosome and recurrent spontaneous abortion: the significance of transmanifesting carriers. *Am J Hum Genet.* 1999b;6(4):934-8.
- 128.Lanasa MC, Hogge WA. X chromosome defects as an etiology of recurrent spontaneous abortion. *Semin Reprod Med.* 2000;18(1):97-103.
- 129.Lanasa MC, Hogge WA, Kubick JC, Ness RB, Harger J, Nagel T , et al. A novel X chromosome-linked genetic cause of recurrent spontaneous abortion. *Am J Obstet Gynecol.* 2001;185(3):563-8.
- 130.Lau WA, Brown CJ, Penaherrera M, Langlois S, Kalousek DK, Robinson WP. Skewed X-Chromosome inactivation is common in fetuses or newborns associated with confined placental mosaicism. *Am J Hum Genet.* 1997;61(6):1353–61.
- 131.Lee J, Jaenisch R. The (epi)genetic control of mammalian X-chromosome inactivation. *Curr Opin Genet Dev.* 1997;7(2):274-80.
- 132.Lee JT, Staruss WM, Dausman JA, Jaenisch RA. 450kb transgene displays properties of the mammalian X-inactivation. center. *Cell.* 1996;86(1):83-94.
- 133.Lee JT, Lu N. Targeted mutagenesis of Tsix leads to nonrandom X inactivation. *Cell.* 1999;99(1):47-57.
- 134.Lee JT. Regulation of X-Chromosome counting by Tsix and Xite sequences. *Science.* 2005;309(5735):768-71.
- 135.Li P, Bellows AB, Thompson JN. Molecular basis of iduronate-2-sulphatase gene mutations in patients with mucopolysaccharidosis type II (Hunter syndrome). *J Med Gen.* 1999;36(1):21-7.
- 136.Liebaers I, Neufeld E. Iduronate sulfatase activity in serum, lymphocytes and fibroblasts-simplified diagnosis of the Hunter syndrome. *Pediatr Res.* 1976;10(8):733-6.
- 137.Lewin B. Nucleosomos. In: Benjamin Lewin, editor. *Tratado de Genética e Biologia Molecular.* Porto Alegre: Artmed; 2001. P.574-86.
- 138.Lin SP, Chang JH, Lee-Chen GJ, Lin DS, Linh HY, Chuang CK. Detection of Hunter syndrome (mucopolysaccharidosis type II) in Taiwanese: biochemical and linkage studies of iduronate-2-sulfatase gene defects in MPS II patients and carriers. *Clin Chim Acta.* 2006;369(1):29-34.
- 139.Lyon MF. Gene Action in the X-chromosome of the Mouse (*Mus musculus L.*). *Nature.* 1961;190: 372 –73.
- 140.Lyon MF. Sex chromatin and gene action in the mammalian X-chromosome. *Am J Hum Genet.* 1962;14:135-48.

141. Lyon MF. Possible mechanisms of the X chromosome inactivation. *Nat New Biol.* 1971;232(24):229-32.
142. Machill G, Barbujani G, Danieli GA, Hermann FH. Segregation and sporadic cases in families with Hunter's syndrome. *J Med Genet.* 1991;28(6):398-401.
143. Maier EM, Kammerer S, Muntau AC, Wichers M, Braun A, Roscher AA. Symptoms in carriers of adrenoleukodystrophy relate to skewed X-inactivation. *Ann Neurol.* 2002;52(5):683-8.
144. Maier EM, Osterrieder S, Whybra C, Ries M, Gal A, Beck M, et al. Disease manifestations and X inactivation in heterozygous females with Fabry disease. *Acta Paediatr Suppl.* 2006;95:30-8.
145. Marahrens Y, Panning B, Dausman J, Strauss W, Jaenisch R. Xist-deficient mice are defective in dosage compensation but not spermatogenesis. *Genes Dev.* 1997;11(2):156-66.
146. Marahrens Y, Loring J, Jaenisch R. Role of the Xist gene in X chromosome choosing. *Cell.* 1998;92(5):657-64.
147. Martin R, Beck M, Eng C, Giugliani R, Hamartz P, Munoz V et al. Recognition and diagnosis of mucopolysaccharidosis II (Hunter syndrome). *Pediatrics.* 2008;121(2):e377-86.
148. Martinez R, Bonilla-Henao V, Jimenez A, Lucas M, Vega C, Ramos I, et al. Skewed X inactivation of the normal allele in fully mutated female carriers determines the levels of FMRP in blood and the fragile X phenotype. *Mol Diagn* 2005;91(3):157-62.
149. Mack W, Nesterova TB, de Napoles M, Appanah R, Yamanaka S, Otte AP, et al. Reactivation of the paternal X chromosome in early mouse embryos. *Science.* 2004;303(5658):666-9.
150. Meikle PJ, Hopwood JJ, Clague AE, Carey WF. Prevalence of lysosomal disorders. *JAMA.* 1999;281(3):244-54.
151. Migeon BR, Kennedy JF. Evidence for the inactivation of an X chromosome early in the development of the human female. *Am J Hum Genet.* 1975;27(2):233-9.
152. Migeon BR, Sprenkle JA, Liebaers I, Scott JF, Neufeld EF. X-linked Hunter syndrome: the heterozygous phenotype in cell culture. *Am J Hum Genet.* 1977;29(5):448-54.
153. Migeon BR, Do TT. In search of non-random X inactivation: studies of fetal membranes heterozygous for glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Am Hum J Genet.* 1979;31(5):581-5.

154. Migeon BR, Moser AB, Axelmann J, Silience D, Norum RA. Adreno leucodystrophy: evidence for X linkage favouring the mutant allele in heterozygous cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1981;78(8):5066-70.
155. Migeon BR, Shapiro LJ, Norum RA, Mohandas T, Axelman J, Dabora RL. Differential expression of steroid sulphatase locus on active and inactive human X chromosome. *Nature*. 1982;299(5886):838-40.
156. Migeon BR, Wolf SF, Axelman J, Kaslow DC, Schmidt M. Incomplete X chromosome dosage compensation in chorionic villi of human placenta. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1985;82(10):3390-4.
157. Migeon BR, Luo S, Stasiowski BA, Jani M, Axelman J, van Dyke DL, et al. Deficient transcription of XIST from tiny ring X chromosomes in females with severe phenotypes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993;90(24):12025-9.
158. Migeon BR, Luo S, Jani M, Jeppesen P. The severe phenotype of females with tiny ring X chromosomes is associated with inability of these chromosomes to undergo to X inactivation. *Am J Hum Genet*. 1994;55(3):497-504.
159. Migeon BR, Jeppesen P, Torchia BS, Fu S, Dunn MA, Axelman J, et al. Lack of X inactivation associated with maternal X isodisomy: evidence for a coupling mechanism prior to X inactivation during human embryogenesis. *Am J Hum Genet*. 1996;58(1):161-70.
160. Migeon BR. Non-random X chromosome inactivation in mammalian cells. *Cytogenet Cell Genet*. 1998;80(1-4):142-8.
161. Migeon BR, Axelman J, Jeppesen P. Differential X reactivation in human placental cells: implications for reversal of X inactivation. *Am J Hum Genet*. 2005;77(3):355-64.
162. Migeon BR. The role of X inactivation and cellular mosaicism in women's health and sex-specific diseases. *JAMA*. 2006;295(12):1428-33.
163. Migeon BR. *Females are Mosaics: X inactivation and sex differences in disease*. 1th ed. New York: Oxford University Press; 2007. 271p.
164. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting-out procedure for extracting DNA from nucleated cells. *Nucleic Acid Res*. 1988;16(3):1215.
165. Minks J, Robison WP, Brown CJ. A skewed view of chromosome inactivation. *J Clin Invest*. 2008;118(1):20-3.
166. Mlynarczyk-Evans S, Royce-Tolland M, Alexander MK, Andersen AA, Kalantry S, Gribanu J, et al. X chromosomes alternate between two states prior to random X inactivation. *PLoS Biol*. 2006;4(6):e159.

167. Mohandas T, Geller RL, Yen PH, Rosendorff J, Bernstein R, Yoshida A, Shapiro LJ. Cytogenetic and molecular studies on a recombinant human X chromosome: implications for the spreading of the X chromosome inactivation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1987;84(14):4954-8.
168. Mohandas TK, Passage MB, Williams JW 3rd, Spakers RS, Yen PH, Shapiro LJ. X-chromosome inactivation in cultured cells from human chorionic villi. *Somat Cell Mol Genet*. 1989;15(2):131-6.
169. Moorhead PS, Nowell PC, Mellmann WJ, Battips DM, Hungerford DA. Chromosome preparations of leukocytes cultured from peripheral blood. *Exp. Cell. Res.* 1960;20:61 613-16.
170. Morleo M, Franco B. Dosage compensation of the mammalian X chromosome influences the phenotypic variability of X-linked dominant male-lethal disorders. *J Med Genet*. 2008;45(7):401-8.
171. Monkroost K, Jonkers I, Rentmeester E, Grosveld F, Gribnau J. X inactivation counting and choice is a stochastic process: evidence for involvement of an X linked activator. *Cell*. 2008;132(3):410-21.
172. Mosmann J, Blunt S, Stephens R, Jones EE, Pembrey M. Hunter's disease in a girl: association with X:5 chromosomal translocation disrupting the Hunter gene. *Arch Dis Child*. 1983;58(11):911-5.
173. Muenzer J. Mucopolysaccharidoses. *Adv Pediatr*. 1986;33:269-302.
174. Muenzer J, Neufeld EF, Constantopoulos G, Caruso RC, Kaiser-Kupfer MI, Pikus A, et al. Attempted enzyme replacement using human amnion membrane implantations in mucopolysaccharidosis. *J Inher Metab Dis*. 1992;15(1):25-37.
175. Muenzer J, Wraith JE, Beck M, Giugliani R, Hamartz P, Eng CM, et al. A phase II/III clinical study of enzyme replacement therapy with idursulfase in mucopolysaccharidosis II (Hunter syndrome). *Genet Med*. 2006;8(8):465-73.
176. Muenzer J, Cucsavas-Calikoglu M, McCandless SE, Schuetz TJ, Kimura A. A phase I/II clinical trial of enzyme replacement therapy in mucopolysaccharidosis II (Hunter syndrome). *Mol Genet Metab*. 2007;90(3):329-37.
177. Nance WE. Do twin Lyons have large spots? *Am J Hum Genet*. 1990;46:646-48.
178. Naumova AK, Plenge RM, Bird LM, Leppert M, Morgan K, Willard HF, et al. Heritability of X chromosome inactivation phenotype in a large family. *Am J Hum Genet*. 1996;58(6):1111-19.
179. Naumova AK, Olien L, Bird LM, Smith M, Verner AE, Leppert M, et al. Genetic mapping of X-linked loci involved in skewing of X chromosome inactivation in the human. *Eur J Human Genetics*. 1998;6(6):552-62.

180. Navarro P, Pichard S, Ciaudo C, Avner P, Rougeulle C. Xist transcription across the Xist gene alters chromatin conformation without affecting Xist transcription: implications for X-chromosome inactivation. *Genes Dev.* 2005;19(12):1474-8.
181. Nelson J. Incidence of the mucopolysaccharidosis in Northern Ireland. *Hum Genet.* 1997;101(3):355-8.
182. Nelson J, Crowhurst J, Carey B, Greed L. Incidence of the mucopolysaccharidosis in Western Australia. *Am J Med Genet.* 2003;123A(3):310-3.
183. Liebaers I, Neufeld E. Iduronate sulfatase activity in serum, lymphocytes and fibroblasts—simplified diagnosis of the Hunter syndrome. *Pediatr Res.* 1976;10(8):733-6.
184. Neufeld EF, Liebaers I, Epstein CJ, Yatziv S, Milunsky A, Migeon BR. The Hunter syndrome in females: is there an autosomal recessive form of iduronate sulfatase deficiency? *Am J Hum Genet.* 1977;29(5):445-46.
185. Neufeld EF, Muenzer J. The Mucopolysaccharidoses. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, editors. *The metabolic and molecular basis of inherited disease.* New York: McGraw-Hill; 2001. p.3421-52.
186. Nguyen DK, Distèche CM. Dosage compensation of the active X chromosome in mammals. *Nat Genet.* 2006;38(1):47-53.
187. Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF. Padrões de herança de genes únicos. In: Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF, editors. *Thompson e Thompson Genética Médica.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2002. p.44-68.
188. Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF. Padrões de herança de genes únicos. In: Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF, editors. *Thompson e Thompson Genética Médica.* Rio de Janeiro: Elsevier; 2008. p.117-54.
189. Nwokoro N, Neufeld EF. Detection of Hunter heterozygotes by enzymatic analysis of hair roots. *Am J Hum Genet.* 1979;(1):42-9.
190. Nybo AA, Wohlfhart J, Christens P, Olsen J, Melbye M. Is maternal age an independent risk factor for fetal loss? *West J Med.* 2000;173(5):331.
191. Ohlsson R, Renkawitz R, Lobanenkov V. CTCF is a uniquely versatile transcription regulator linked to epigenetics and disease. *Trends Genet.* 2001;17(9):520-7.
192. Ohno S. *Chromosomes and sex-linked genes.* [Monographs on Endocrinology]. Heidelberg, Springer-Verlag; 1967.
193. Ogawa Y, Lee JT. Xite, X-inactivation intergenic transcription elements that regulate the probability of choice. *Mol Cell.* 2003;11(3):731-43.

194. Okamoto I, Otte AP, Allis CD, Reiberg D, Heard E. Epigenetics dynamics of imprinted X inactivation during early mouse development. *Science*. 2004;303(5658):644-9.
195. OMIN[®] [Internet]. United Kingdom: Online Mendelian Inheritance in Man[®] Baltimore: Johns Hopkins University Inc; [updated 2009; cited Jul 2009] Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omin>
196. Oostra BA, Hupkes PE, Perdon LF, van Bennekon CA, Bakker E, Halley DJ, et al. New polymorphic DNA marker close to the fragile site FRAXA. *Genomics* 1990;6(1):129-32.
197. Orstavik KH, Orstavik RE, Eiklid K, Tranebjaerg L. Inheritance of skewed X chromosome inactivation in a large family an X-linked recessive deafness syndrome. *Am J Med Genet*. 1996;64(1):31-4.
198. Panning B, Jaenisch R. DNA hypomethylation can activate Xist expression and silence X-linked genes. *Genes Dev*. 1996;10(16):1991-2002.
199. Panning B, Dausman J, Jaenisch R. X chromosome inactivation is mediated by XIST RNA stabilization. *Cell*. 1997;90(5):907-16.
200. Pasquier E, Bohec C, De Saint Martin L, Le Maréchal C, Le Martelot MT, Roche S, et al. Strong evidence that skewed X-chromosome inactivation is not associated with recurrent pregnancy loss: an incident paired case control study. *Hum Reproduction*. 2007;22(11):2829-33.
201. Pegoraro E, Whitaker J, Mowery-Rushton P, Surti U, Lanasa M, Hoffman EP. Familial skewed X inactivation: a molecular trait associated with high spontaneous-abortion rate maps Xq28. *Am J Hum Genet*. 1997;6(1):160-70.
202. Penny GD, Kay GF, Sheardown SA, Rastan S, Brockdorff N. Requirement for Xist in X chromosome inactivation. *Nature*. 1996;379(6561):131-7.
203. Perry P, Wolf S. New Giemsa method for differential staining of sister chromatids. *Nature*. 1974;251(5471):156-8.
204. Peters C, Krivit W. Hematopoietic cell transplantation for mucopolysaccharidosis IIB (Hunter syndrome). *Bone Marrow Transplant*. 2000;25(10):1097-9.
205. Platt FM, Walkley SU. *Lysosomal Disorders of the Brain*. 1st ed. Great Britain: Oxford University Press; 2004. 447 p.
206. Plenge RM, Hendrich BD, Schwartz C, Arena JF, Naumova A, Sapienza C, et al. A promoter mutation in the XIST gene in two unrelated families with skewed X-chromosome inactivation. *Nature Genetics*. 1997;17(3):353-6.

207. Plenge RM, Tranebjaerg L, Jensen PK, Schwartz C, Willard HF. Evidence that mutations in the X-linked DDP gene cause incompletely penetrant and variable skewed X inactivation. *Am J Hum Genet.* 1999;64(3):759-67.
208. Plenge RM, Stevenson RA, Lubs HA, Schwartz CE, Willard HF. Skewed X-chromosome inactivation is a common feature of X-linked mental retardation disorders. *Am J Hum Genet.* 2002;71(1):168-73.
209. Poorthuis BJ, Wevers RA, Kleijer WJ, Groener JE, de Jong JG, van Weely S, et al. The frequency of lysosomal storage in the Netherlands. *Hum Genet.* 1999; 105(1-2):151-6.
210. Prchal JT, Guan YL, Prchal JF, Barany F. Transcriptional analysis of X active chromosome in normal and clonal hematopoiesis. *Blood.* 1993;1(81):269-71.
211. Puck JM, Nussbaum RL, Conley ME. Carrier detection in X-linked severe combined immunodeficiency based on patterns of X chromosome inactivation. *J Clin Invest.* 1987;79(5):1395-400.
212. Puck JM, Stewart CC, Nussbaum RL. Maximum-likelihood analysis of human T-cell X-chromosome inactivation patterns: normal women versus carriers of X-linked severe combined immunodeficiency. *Am J Hum Genet.* 1992;50:742-48.
213. Puck JM, Willard HF. X inactivation in females with X linked disease. *N Engl J Med.* 1998;338(5):325-8.
214. Rack KA, Chelly J, Gibbons RJ, Rider S, Benjamin D, Lafreniere RG, et al. Absence of the XIST gene from late-replicating isodicentric X chromosome in leukaemia. *Hum Mol Genet.* 1994;3(7):1053-9.
215. Rai R, Regan L. Recurrent miscarriage. *Lancet.* 2006;368(9535):601-11.
216. Rastan S, Robertson EJ. X-chromosome deletions in embryo-derived (EK) cell lines associated with lack of X-chromosome inactivation. *J Embryol Morphol.* 1985;90:379-88.
217. Rastan S. Non-random X chromosome inactivation in mouse X autosome translocation of the inactivation centre. *J Embryol Exp Morphol.* 1993;78:1-22.
218. Rathamnn M, Bunge S, Beck M, Krete H, Tylki-Symanska A, Gal A. Mucopolysaccharidosis type II (Hunter syndrome): "hot spots" in the iduronate-2-sulfatase gene. *Am J Hum Genet.* 1996;59(6):1202-09.
219. Robinson WP, Beever C, Brown CJ, Stephenson MD. Skewed X inactivation and recurrent spontaneous abortion. *Semin Reprod.* 2001;19(2):175-81.

- 220.Ropers HH, Wolf G, Hitzeroth HW. Preferential X inactivation in human placenta membranes: is the paternal X inactive in early embryonic development of female mammals? *Hum Genet.* 1978;43(3):265-73.
- 221.Ross MT, Grafham DV, Coffey AJ, Scherer S, McLay K, Muzny D, et al. The DNA sequence of the X human chromosome. *Nature.* 2005;434(7031):325-37.
- 222.Rosseau F, Heitz D, Oberlé I, Mandel JL. Selection in blood cells from female carriers of the fragile X syndrome: inverse correlation between age and proportion of active X chromosome carrying the full mutation. *J Med Genet.* 1991;28(12):830-6.
- 223.Russel LB. Mammalian X-chromosome action: inactivation limited in spread and in region of origin. *Science.* 1963;140:976-78.
- 224.Sado T, Wang Z, Sasazi H, Li E. Regulation of imprinted X chromosome inactivation in mice by Tsix. *Development.* 2001;128(8):1275-86.
- 225.Salido EC, Yen PH, Mohandas TK, Shapiro LJ. Expression of the X-inactivation-associated gene XIST during spermatogenesis. *Nat Genet.* 1992;2(3):196-9.
- 226.Sandovici I, Naumova AK, Leppert M, Linares Y, Sapienza C. A longitudinal study of X-inactivation ratio in human females. *Hum Genet.* 2004;115(5):387-92.
- 227.Sangha KK, Stephenson MD, Brown CJ, Robinson WP. Extremely skewed X-chromosome inactivation is increased in women with recurrent spontaneous abortion. *Am J Hum Genet.* 1999;65(3):913-7.
- 228.Sanjurio-Crespo P. Clinical aspects of mucopolysaccharidosis type II. *Rev Neurol* 2007;Suppl 1:S3-6.
- 229.Savarese F, Flahndorfer K, Jaenisch R, Busslinger M, Wutz A. Hematopoietic precursor cells transiently reestablish permissiveness for X inactivation. *Mol Cell Biol.* 2006;26(19):7167-77.
- 230.Schaap T, Bach G. Incidence of mucopolysaccharidosis in Israel: is Hunter disease a "Jewish disease"? *Hum Genet.* 1980;56(2):221-3.
- 231.Schwartz IV. Estudo clínico, bioquímico e genético de pacientes com mucopolissacaridose II e de possíveis heterozigotas [dissertação]. [Porto Alegre]: Universidade do Rio Grande do Sul; 2004. 160 p.
- 232.Schwartz IV, Ribeiro MG, Mota JG, Toralles MB, Correia P, Horovitz D, et al. A clinical study of 77 patients with mucopolysaccharidosis type II. *Acta Paediatr Suppl.* 2007;96(455):63-70.
- 233.Seabright M. A rapid technique for human chromosomes. *Lancet.* 1971;2(7731):971-2

234. Sharp A, Robinson D, Jacobs P. Age- and tissue specific variation of X chromosome inactivation ratios in normal women. *Hum Genet.* 2000;107(4):343-9.
235. Schroder W, Petruschka L, Wehnert M, Zschiesche M, Seidlitz G, Hopwood JJ, et al. Carrier detection of Hunter syndrome (MPS II) by biochemical and DNA techniques in families at risk *J Med Genet.* 1993;30(3):210-3.
236. Sheardown SA, Duthie SM, Johnston CM, Newall AE, Formstone EJ, Arkell RM, et al. *Cell.* 1997;91(1):99-107.
237. Shen Y, Matsuno Y, Fouse SD, Rao N, Root S, Xu R, et al. X inactivation in female human embryonic stem cells is nonrandom pattern and prone to epigenetic alterations. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008;105(12):4709-14.
238. Sleeper MM, Fornasari B, Ellinwood NM, Weil MA, Melniczek J, O'Malley TM, et al. Gene therapy ameliorates cardiovascular disease in dogs with mucopolysaccharidosis VII. *Circulation.* 2004;110(7):815-20.
239. Spatz A, Borg C, Feunteun J. X-chromosome genetics and human cancer. *Nat Rev Cancer.* 2004;4(8):617-29.
240. Stephenson MD, Awartani KA, Robinson WP. Cytogenetic analysis of miscarriages from couples with recurrent miscarriage: a case-control study. *Hum Reprod.* 2002;17(2):446-51.
241. Stone S, Adinolfi M. Carrier detection of deletion of Hunter gene by situ hybridization. *Am Hum Genet.* 1992;56(Pt2):93-7.
242. Stroncek DF, Hubel A, Shankar RA, Burger SR, Pan D, McCullough J, et al. Retroviral transduction and expansion of peripheral blood lymphocytes for the treatment of mucopolysaccharidosis type II, Hunter's syndrome. *Transfusion.* 1999;39(4):343-50.
243. Sukegawa K, Song XQ, Masuno M, Fukao T, Schmozawa N, Fukuda S, et al. Hunter disease in a girl caused by R468Q mutation in the iduronate-2-sulfatase gene and skewed inactivation of the X chromosome carrying the normal allele. *Hum Mut.* 1997;10(5):361-7.
244. Sukegawa K, Matsuzaki T, Fukuda S, Masuno M, Fukao T, Kokuryu M, et al. Brother/sister sibilings affected with Hunter disease: evidence for skewed X chromosome inactivation. *Clin Genet.* 1998;53(2):96-101.
245. Sukegawa-Haasaka K, Kato Z, Nakamura H, Tomatsu S, Fuakao T, Kuwata K, et al. Effect of Hunter disease (mucopolysaccharidosis type II) mutations on molecular phenotypes of iduronate-2-sulfatase: enzymatic activity, protein processing and structural analysis. *J Inherited Metab Dis.* 2006;29(6):755-61.

246. Sullivan AE, Lewis T, Stephenson M, Odem R, Schreiber J, Ober C, et al. Pregnancy outcome in recurrent miscarriage patients with skewed X chromosome inactivation. *Obstet Gynecol.* 2003;101(6):1236-42.
247. Suthers GK, Callen DF, Hyland VJ, Kozman HM, Baker E, Eyre H, et al. A new DNA marker tightly linked to the fragile X locus. *Science.* 1989a;246(4935):1298-300.
248. Suthers GK, Davies KE, Baker E, Sutherland GR. TaqI RFLP identified by probe 1A1 (DXS374) at Xq28. *Nucleic Acids Res.* 1989b;17(21):8901.
249. Suthers GK, Hyland VJ, Callen DF, Oberle I, Rocchi M, Thomas NS, et al. Physical mapping of new DNA probes near the fragile X mutation (FRAXA) by using a panel of cell lines *Am J Hum Genet.* 1990;47(2):187-95.
250. Talebizadeh Z, Bittel DC, Veatch OJ, Kibiryeva N, Butler MG. Brief report: non-random X chromosome inactivation in females with autism. *J Autism Dev Disord.* 2005;35(5):675-81.
251. Talebizadeh Z, Simon SD, Butler MG. X chromosome gene expression in human tissues: male and female comparisons. *Genomics.* 2006;88(6):675-81.
252. Timms KM, Bondenson ML, Ansari-Lari MA, Lagerted K, Munzy DM, Dungan-Rocha SP, et al. Molecular and phenotypic variation in patients with severe Hunter syndrome. *Hum Mol Genet.* 1997;6(3):479-86.
253. Timms KM, Edwards FJ, Belmont JW, Yates JRW, Gibbs RA. Reassessment of biochemically determined Hunter syndrome carrier status by DNA testing. *J Med Genet.* 1998;35(8):646-49.
254. Tomanin R, Friso A, Alba S, Piller Puicher E, Mennuni C, La Monica N, et al. Non-viral transfer approaches for the gene therapy of mucopolysaccharidosis type II (Hunter syndrome). *Acta Paediatr Suppl.* 2002;91(439):100-4.
255. Tonnesen T, Guttler F, Lykkelund C. Reability of the use of fructose 1-phosphate to detect Hunter cells in fibroblast-culture of obligate carriers of Hunter syndrome. *Hum Genet.* 1983;64(4):371-75.
256. Tonnesen T. The use of fructose 1-phosphate to detect Hunter heterozygotes in fibroblast cultures from high-risk carriers. *Hum Genet.* 1984;66(2-3):212-6.
257. Tuschl K, Gal A, Paschke E, Kircher S e Bodamer OA. Mucopolysaccharidosis type II in females case report and review of literature. *Pediatr Neurol.* 2005;32:270-72.

258. Uehara S, Hashiyada M, Sato K, Sato Y, Fujimori K, Okamura K. Preferential X-chromosome inactivation in women with idiopathic recurrent pregnancy loss. *Fertil Steril*. 2001;76(5):908-14.
259. Valleix S, Vinciguerra C, Lavergne JM, Delphech M, Negirer C. X-chromosome inactivation in monozygotic diamniotic twin sisters results in severe and mild hemophilia A. *Blood*. 2002;100(8):3034-36.
260. Vedolin L, Schwartz IV, Komlos M, Schuch A, Puga AC, Pinto LL, et al. Correlation of MR imaging and MR spectroscopy findings with cognitive impairment in mucopolysaccharidosis II. *Am J Neuroradiol*. 2007;28(6):1029-33.
261. Vellodi A, Young E, Cooper A, Lidchi V, Winchester B, Wraith JE. Long-term follow-up following bone marrow transplantation for Hunter disease. *J Inher Metab Dis*. 1999;22(5):638-48.
262. Vieira T, Schwartz I, Munoz V, Pinto L, Steiner C, Ribeiro M, et al. Mucopolysaccharidoses in Brazil: what happens from birth to biochemical diagnosis? *Am J Med Genet*. 2008;146A(13):1741-7.
263. Vigneau S, Augui S, Navarro P, Avner P, Clerc P. An essential role for the DXPas34 tandem repeat and Tsix transcription in the coating process of X chromosome inactivation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006;103(19):7390-5.
264. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Preisinger AC, Willard HF, Michelson AM, et al. Clonal analysis using recombinant DNA probes from the X-chromosome. *Cancer Res*. 1987;47(18):4806-13.
265. Voznyi YV, Keulemans JL, van Diggelen OP. A fluorimetric enzyme assay for the diagnosis of MPS II (Hunter disease). *J Inher Metab Dis*. 2001;24(6):675-80.
266. Walkey SU. Pathogenic cascades in lysosomal disease-Why so complex? *J Inher Metab Dis*. 2009;32:181-9.
267. Wareham KA, Lyon MF, Glenister OH, Williams ED. Age related of an X-linked gene. *Nature*. 1987;327:725-7.
268. Warren JE, Silver RM. Genetics of pregnancy loss. *Clin Obstet Gynecol*. 2008;51:84-95.
269. Wang RY, Lelis A, Mirocha J, Wilcox WR. Heterozygotes Fabry women are not just carriers, but have a significant burden of disease and impaired quality of life. *Genet Med*. 2007;9:34-45.
270. Whitley CB. The mucopolysaccharidosis. In: Beighton P, editor. *McKusick's Heritable Disorders of Connective Tissue*. St Louis: Mosby;1993. p.367-498.

271. Wraith JE: Lysosomal disorders. *Semin Neonatol.* 2002;7:75-83.
272. Wraith JE, Scarpa M, Beck M, Bodamer AO, De Meileir L, Guffon N, et al. Mucopolysaccharidosis type II (Hunter syndrome): a clinical review and recommendations for treatment in the era of enzyme replacement therapy. *Eur J Pediatr.* 2008;167:267-77.
273. Winchester B, Young E, Geddes S, Genet S, Hurst J, Middleton-Price H, Williams N, Webb M, Habel A, Malcom S. Female twin Hunter disease due to nonrandom inactivation of the X-chromosome: a consequence of twinning. *Am J Med Genet.* 1992;44:834-8.
274. Willard HF. X chromosome inactivation, XIST, and pursuit of the X-inactivation center. *Cell.* 1996; 86:5-7.
275. Willard HF. The sex chromosomes and X chromosome inactivation. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, editors. *The metabolic and molecular basis of inherited disease.* New York: MacGraw-Hill; 2000. p.1191-1211.
276. Wilson PJ, Morris CP, Anson DS, Occhiodoro T, Bielicki J, Clements PR, et al. Hunter syndrome: isolation of an iduronate-2-sulfatase cDNA clone and analysis of patient DNA. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1990;87:8531-5.
277. Wilson PJ, Meaney CA, Hopwood JJ, Morris CP. Sequence of the human iduronate 2-sulfatase (IDS) gene. *Genomics* 1993;17:773-5.
278. Wutz A, Jaenisch R. A shift from reversible to irreversible X inactivation is triggered during ES cell differentiation. *Mol Cell.* 2000;5:685-705.
279. Wutz A, Gribnau J. X inactivation: Xplained. *Curr Opin Genet Dev.* 2007;17:387-93.
280. Young ID, Haper PS. Incidence of Hunter's syndrome. *Hum Genet.* 1982a;60:391-2.
281. Young ID, Haper PS. Mild form of Hunter's syndrome: clinical delineation based on 31 cases. *Arch Dis Child.* 1982b;57:828-36.
282. Young ID, Haper PS, Archer IM, Newcombe RG. A clinical and genetic study of Hunter's syndrome 1. Heterogeneity. *J Med Genet.* 1982a;19:401-7.
283. Young ID, Haper PS, Newcombe RG, Archer IM. A clinical and genetic study of Hunter's syndrome 2. Differences between the mild and severe forms. *J Med Genet.* 1982b;19:408-11.

284. Young ID, Haper PS. The natural history of severe form of Hunter's syndrome. A study based on 52 cases. *Dev Med Child Neurol.* 1983;25:481.
285. Yutaka T, Fluharty AL, Stevens RL, Kihara H. Iduronate sulfatase analysis of hair roots for identification of Hunter syndrome heterozygotes. *Am J Hum Genet.* 1978;30:575-82.
286. Zabel BU, Baumann WA, Pirntke W, Gerhard-Ratschow K. X inactivation pattern in three cases of X/autosome translocation. *Am J Med Genet.* 1978;1:309-17.
287. Zareba G. Idursulfase in Hunter syndrome treatment. *Drugs Today.* 2007;43:759-67.
288. Zlogotora J, Bach G. Heterozygote detection in Hunter syndrome. *Am J Med.* 1986;17:661-5.

ANEXOS

ANEXO 1 –TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Você está sendo convidado a participar do projeto de pesquisa: “Avaliação de manifestações clínicas e laboratoriais de heterozigotas mucopolissacaridose tipo II”. Este projeto tem por objetivo verificar a possibilidade de sinais clínicos sutis e bioquímicos de mucopolissacaridose tipo II em você.

Serão convidadas a participar do projeto todas as mulheres com história familiar positiva que tem filhos acompanhados no ambulatório de MPS do Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (SGM-HCPA).

Você será questionada sobre sua história familiar, história médica e cirúrgica, idade do início da menstruação e menopausa, história gestacional, sintomas relacionados a doenças cardiológicas, pulmonares, osteoarticulares e uso de medicação.

Os dados coletados e sua foto serão utilizados somente para este projeto de pesquisa e a identificação dos participantes será mantida confidencial.

Você realizará coleta de sangue para os exames de dosagem enzimática, cariótipo e biomarcadores. A coleta de sangue que será realizada envolve os mesmos riscos e desconfortos que a coleta de exames de rotina laboratoriais sanguíneos. Também será coletada uma amostra de urina ocasional para dosagem de glicosaminoglicanos. Uma pequena incisão na sua pele (de tamanho ao redor de 0,2mm) será realizada após a assepsia e anestesia local para a realização de biópsia de pele. Isto poderá causar algum desconforto. Não será necessário fazer sutura no local da incisão. Em relação aos exames de imagem temos que a tomografia de abdome e de coluna e a ressonância magnética de crânio serão realizadas sem contraste e sem anestesia geral, não implicando nenhum risco para você.

Este projeto não oferece nenhum tipo de benefício financeiro aos participantes. Mas, todas as despesas relacionadas aos exames realizados serão pagas pelo orçamento da

pesquisa. Em relação aos benefícios indiretos, acredita-se que essa pesquisa pode proporcionar um melhor entendimento da doença através do estudo das heterozigotas para mucopolissacaridose tipo II.

A sua participação é voluntária. Se você não participar deste projeto, não haverá nenhum prejuízo em seu atendimento ou de seu(s) filhos no ambulatório de MPS do SGM-HCPA ou em qualquer outro serviço deste hospital.

Informo que você tem a garantia de acesso sobre qualquer esclarecimento ou dúvidas. Os pesquisadores responsáveis por este projeto são a Médica Geneticista Louise Lapagesse de Camargo Pinto, a Dra Ida Vanessa Schwartz e o Dr Roberto Giugliani. Eles estão à disposição pelos telefones (51) 2101-8011 ou (51) 9994-6066. Após a assinatura, você receberá uma cópia deste documento.

Assim que todos os resultados estiverem prontos você receberá um relatório com todas as informações pertinentes.

Declaro que fui informado de forma clara e detalhada sobre o projeto e que tive minhas dúvidas esclarecidas.

Nome do participante:

Assinatura:

Data:

Nome da pessoa que aplicou o Termo:

Assinatura:

Data:

**ANEXO 2- TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA
OBTENÇÃO DE IMAGENS FOTOGRÁFICAS**

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para obtenção de fotografia e imagens

Eu, _____ concordo com a utilização de minhas imagens fotográficas incluindo rosto, sem a divulgação simultânea do meu nome, ou qualquer forma de identificação; para fins de documentação de investigação diagnóstica, bem como o uso de publicação científica. As imagens fotográficas ficarão no Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, e fazem parte do projeto de doutorado: Avaliação de manifestações clínicas e laboratoriais de heterozigotas mucopolissacaridose tipo II”. Os pesquisadores responsáveis por este projeto são a Médica Geneticista Louise Lapagesse de Camargo Pinto, a Dra Ida Vanessa Schwartz e o Dr Roberto Giugliani. Eles estão à disposição pelos telefones (51) 2101-8011 ou (51) 9994-6066. Após a assinatura, você receberá uma cópia deste documento.

Nome do paciente: _____

Assinatura: _____

Data: _____

Médica responsável _____

ANEXO 3- QUESTIONÁRIO E EXAME FÍSICO

Questionário e Exame Físico

Paciente número _____
Família número _____
Mutação _____

FICHA DE AVALIAÇÃO**PROTOCOLO “ESTUDO CLÍNICO E LABORATORIAL DE HETEROZIGOTAS
PARA MUCOPOLISSACARIDOSE II”****DATA DA AVALIAÇÃO:****1) Identificação****NOME:****DATA DE NASCIMENTO:****IDADE NA AVALIAÇÃO:****NATURALIDADE:****ENDEREÇO:****TELEFONE:****EMAIL:****NOME DO PACIENTE AFETADO E PARENTESCO:****HETEROZIGOTA: () sim**

- não
 desconhecido

2) Dados Gineco-Obstétricos:

MENARCA (idade em anos):

MENOPAUSA (idade em anos):

GESTA _____ PARA _____ CESA _____ ABO _____

ABORTAMENTO ESPONTÂNEOS:

Ano

Trimestre de gestação

DIFICULDADE PARA ENGRAVIDAR?

sim . Fez algum tratamento? Qual? Foi descoberto o motivo?

não

HEREDOGRAMA (no mínimo 3 gerações, indicando idade de todos os indivíduos:

3) PERFIL PSICOSSOCIAL:

Escolaridade: _____

Profissão: _____

4) MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS (anamnese):

1. CARDIOLÓGICOS () NÃO () SIM, QUAIS?

2. PULMONARES () NÃO () SIM, QUAIS?

3. OSTEOARTICULARES () NÃO () SIM, QUAIS?

4. USO DE MEDICAÇÕES () NÃO () SIM, QUAIS?

5. OUTRA DOENÇA ASSOCIADA () NÃO () SIM, QUAIS?

INTERNAÇÕES PRÉVIAS? () NÃO

() SIM. QUAIS?

CIRURGIAS PRÉVIAS? () NÃO
() SIM. QUAIS?

5)EXAME FÍSICO:

Idade:

Peso:

Altura:

Perímetro cefálico:

Face:

ACV:

Hepatomegalia?

Esplenomegalia?

Contraturas articulares?

Lesões cutâneas?

Opacificação córnea?

**ANEXO 4- SUMÁRIO DOS DADOS EPIDEMIOLÓGICOS E CLÍNICOS DAS
PACIENTES INCLUÍDAS NESSE ESTUDO**

Quadro 1. Dados da anamnese das heterozigotas para Mucopolissacaridose tipo II (n = 22)

Identificação	Idade (anos)	Menarca (idade)	Menopausa (idade)	Gestações (n)	Abortamento espontâneo (n)	Abortamento espontâneo (idade)	Doenças	Cirurgias	Internações	Família (número)
1	31	12	NA	2	0	NA	não	não	não	1
2	40	10	NA	3	1*	18	não	não	não	2
3	33	12	NA	1	0	NA	não	não	sim ¹	3
4	27	12	NA	2	0	NA	não	não	sim ²	4
5	48	14	NA	2	0	NA	sim ³	sim ⁴	não	5
6	52	10	NA	2	0	NA	sim ³	sim ^{4,5}	sim ⁵	6
7	46	15	40	3	0	NA	sim ³	sim ⁴	não	7
8	37	13	NA	1	0	NA	não	não	não	8
9	33	9	NA	2	0	NA	não	não	sim ⁶	9
10	33	12	NA	2	0	NA	não	não	não	9
11	35	10	NA	1	0	NA	não	não	não	10
12	35	12	NA	2	0	NA	não	não	não	11
13	36	12	NA	1	0	NA	não	não	sim ⁶	12
14	34	13	NA	4	2**	21 e 26	sim ⁷	não	não	13
15	43	14	NA	2	0	NA	sim ³	sim ⁸	não	14
16	35	12	NA	3	0	NA	não	não	não	15
17	23	12	NA	2	1*	21	não	não	não	16
18	22	12	NA	2	0	NA	não	não	não	17
19	33	15	NA	3	0	NA	não	não	não	18
20	46	14	NA	3	1	não sabe	não	sim ⁴	sim ⁸	18
21	40	15	NA	1	0	NA	não	não	não	19
22	32	13	NA	1	0	NA	sim	não	não	20

NA não aplicável; *primeiro trimestre; **segundo trimestre; ¹infecção urinária; ²infecção uterina; ³hipertensão arterial; ⁴histerectomia; ⁵tratamento de câncer de mama; ⁶amigdalite; ⁷depressão; ⁸apendicectomia

Quadro 2. Dados da anamnese das não heterozigotas para Mucopolissacaridose tipo II (n =18)

Identificação	Idade (anos)	Menarca (idade)	Menopausa (idade)	Gesta (n)	Aborto espontâneo (n)	Aborto espontâneo (idade)	Doenças	Cirurgias	Internações	Família (número)
23	57	11	NA	1	0	NA	sim ¹	sim ²	não	21
24	38	13	NA	1	0	NA	sim ^{5,6}	não	não	24
25	30	11	NA	1	0	NA	não	não	sim	21
26	59	14	55	4	2	não sabe	sim ¹	sim ^{3,4}	não	22
27	41	14	NA	3	0	NA	não	sim	não	23
28	25	11	NA	1	0	NA	não	não	não	9
29	53	14	53	4	1	25	sim ⁵	sim ³	não	24
30	17	11	NA	0	0	NA	não	não	não	10
31	48	12	NA	4	1	30	sim ⁷	não	não	10
32	24	11	NA	1	0	NA	não	não	não	10
33	45	12	38	2	0	NA	não	sim ^{3,8}	não	10
34	14	11	NA	0	0	NA	não	não	não	10
35	42	11	NA	3	1	30	não	não	não	10
36	39	14	NA	3	1	30	não	sim ³	não	10
37	14	12	NA	0	0	NA	não	não	não	10
38	37	12	NA	3	0	NA	não	sim ³	não	10
39	15	12	NA	0	0	NA	não	não	não	10
40	75	12	42	15	2	não sabe	sim ⁵	não	não	10

NA não aplicável; *primeiro trimestre; **segundo trimestre; ¹hipotireoidismo; ²apendicectomia; ³histerectomia; ⁴perineoplastia; ⁵hipertensão arterial; ⁶ovários policísticos; ⁷depressão; ⁸colecistectomia

Quadro 3. Dados do exame físico (antropometria) das heterozigotas para Mucopolissacaridose tipo II (n=22)

Identificação	Perímetro Cefálico (cm)	Estatura (cm)	Peso (kg)
1	57	161	61
2	57	160	60
3	54	157	61
4	52	159	53
5	57	168	97
6	56	159	96
7	58	156	69
8	53	157	48
9	56	172	58
10	53	164	64
11	55	160	80
12	53	153	52
13	53	159	56
14	53	148	53
15	54	164	58
16	55	152	61
17	53	154	54
18	58	167	78
19	54	161	61
20	56	163	119
21	55	158	54
22	58	163	62

Quadro 4. Dados do exame físico (antropometria) nas não heterozigotas para Mucopolissacaridose tipo II

Identificação	Perímetro Cefálico (cm)	Estatuta (cm)	Peso (kg)
23	52	162	54
24	54	154	55
25	57	159	72
26	54	163	61
27	55	170	82
28	53	161	61
29	53	155	55
30	53	158	53
31	53	156	76
32	54	165	55
33	54	157	78
34	54	163	57
35	55	182	82
36	54	163	60
37	53	160	54
38	55	162	57
39	53	167	47
40	56	153	67

Quadro 5. Resultados da tomografia computadorizada de abdômen nas heterozigotas para Mucopolissacaridose tipo II (n= 22)

Identificação	Hepatomegalia ¹ (n=14)	Volume Hepático (cm ³) (n=17)	Volume Hepático (voxels) (n=14)	Volume Hepático Normalizado (%) ² (n=14)	Volume Abdômen (voxels) (n=14)	Esplenomegalia ³ (n=14)	Volume Esplênico (cm ³) (n=14)	Volume Esplênico (voxels) (n=14)	Volume Esplênico Normalizado (%) ⁴ (n=14)
1	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
2	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
3	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
4	leve	1447,84	1104063	14,24	7751217	não	116,06	172683	2,28
5	leve	1723,64	733815	12,03	6098367	leve	421,03	171955	2,82
6	não	2892,21	874521	12,02	7276568	não	246,15	101693	1,40
7	NR	1635,48	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
8	não	1229,9	1030943	18,50	5573634	sim	254,74	217738	3,91
9	leve	1705,48	788443	14,32	5505216	não	236,52	106166	1,93
10	moderada	1677,74	1093208	12,20	8960489	não	56,34	158983	1,77
11	não	1801,27	935147	12,47	7496361	leve	297,89	140986	1,88
12	leve	1285,44	1104063	15,01	7352592	não	180,50	172683	2,34
13	não	1531,26	796102	16,38	4859302	não	190,88	127072	2,61
14	não	1308,04	842087	18,00	4679426	não	137,28	84174	1,80
15	não	858,54	851300	16,26	5236472	não	154,71	112887	2,15
16	não	1697,28	826878	15,69	5268680	não	148,26	78812	1,50
17	NR	1503,94	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
18	NR	1605,98	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
19	não	1490,62	861581	14,70	5860601	não	207,74	147427	2,51
20	não	1673,38	656018	10,07	6515066	não	295,32	88814	1,36
21	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
22	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR

NR não realizado; ¹ hepatomegalia leve < 2 cm abaixo do rebordo do rim direito ou hepatomegalia moderada 2-4cm abaixo do rebordo do rim direito;

²volume hepático (voxels)/volume abdômen (voxels); ³esplenomegalia leve = 12-14 cm ou moderada 14-16cm; ⁴volume esplênico (voxels)/volume abdômen (voxels)

Quadro 6. Resultados da tomografia computadorizada de abdômen nas não heterozigotas para MPS II (n=18)

Identificação	Hepatomegalia ¹ (n=17)	Volume Hepático (cm ³) (n=17)	Volume Hepático (voxels) (n=16)	Volume Abdomem (voxels) (n=16)	Fígado Normalizado (%) ² (n=16)	Esplenomegalia ³ (n=17)	Volume Esplênico (cm ³) (n=16)	Volume Esplênico (voxels) (n=16)	Baço Normalizado (%) ⁴ (n=16)
23	não	1667,95	760817	4873778	15,61	não	102,1	66548	1,36
24	não	1536,46	1042861	6781761	15,38	não	109,8	83562	1,23
25	não	2113,59	1073580	6612015	16,24	não	199,04	109239	1,65
26	não	1464,51	758048	5338278	14,2	não	85,17	41457	0,78
27	leve	2014,29	958857	7429061	12,91	não	257,27	112709	1,52
28	não	1266,23	1254407	7717644	16,27	não	123,3	102143	1,32
29	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
30	moderada	1486,39	1030530	5351940	19,25	não	113,11	70153	1,31
31	não	1677,74	731098	5830849	12,54	não	56,34	36759	0,63
32	leve	1059,7	739843	4554194	16,24	não	137,14	107274	2,35
33	não	1520,53	NR	NR	NR	não	NR	NR	NR
34	não	1697,29	724269	4589824	15,78	leve	228,38	148360	3,23
35	não	2200,87	890420	7226715	12,32	moderada	211,71	108352	1,50
36	não	1199,01	1080445	7161340	15,09	não	156	135811	1,90
37	não	1195,08	1284703	8799492	14,6	não	229,13	222577	2,53
38	não	1527,55	1121794	6934023	16,18	não	136,63	114817	1,65
39	não	822,18	1134438	6104072	18,6	não	133,66	148360	2,43
40	não	1368,9	780824	7189039	10,86	não	115,31	63735	0,89

NR não realizado;¹hepatomegalia leve < 2 cm abaixo do rebordo do rim direito ou hepatomegalia moderada 2-4cm abaixo do rebordo do rim direito;

²volume hepático (voxels)/volume abdômen (voxels);³esplenomegalia leve = 12-14 cm ou moderada 14-16cm;⁴volume esplênico (voxels)/volume abdômen (voxels)

Quadro 7. Resultados da ressonância magnética de crânio nas heterozigotas para MPS II (n=22)

Identificação	Volume liquórico (voxels) (n=7)	Volume ventricular (voxels) (n=7)	Volume cerebral (voxels) (n=5)	Volume cerebral normalizado (%) ¹ (n=7)	Caixa craniana (voxels) (n=7)	Volume cerebral (cm ³) (n=5)	Volume liquórico (cm ³) (n=7)	Volume cerebral total (voxels) (n=5)	Volume ventricular (cm ³) (n=7)	Volume liquórico normalizado ² (%) (n=7)	Volume ventricular normalizado (%) (n=7)	Carga de lesões (voxels) (n=5)	Carga de lesões (cm ²) (n=5)	Carga de lesões (%) ³ (n=7)
1	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
2	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
3	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
4	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
5	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
6	126288	13101	663850	42,45	2136657	1212,09	166,23	1563655	17,24	5,91	0,61	5285	14,84	0,33
7	192694	14818	676391	41,74	2262443	1234,98	253,63	1620251	19,50	8,52	0,65	1686	4,73	0,10
8	231604	5582	661985	49,05	1867325	1208,68	304,85	1349503	7,35	12,40	0,30	2016	5,66	0,14
9	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
10	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
11	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
12	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
13	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
14	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
15	222589	9024	NR	46,81	1928850	NR	2538,85	NR	11,88	11,54	0,47	NR	NR	0,16
16	126991	11410	666442	48,71	1914999	1216,82	2520,62	1368293	15,02	6,63	0,60	9908	27,83	0,72
17	124455	9237	598112	46,50	1702802	1092,06	2241,31	1286203	12,16	7,31	0,54	374	1,05	0,03
18	161567	25386	NR	46,51	2201158	NR	2897,27	NR	33,41	7,34	1,15	NR	NR	0,11
19	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
20	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
21	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
22	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR

NR não realizado ¹volume craniano (voxels)/volume total(voxels); ²volume ventricular (voxels)/caixa craniana (voxels); ³ lesões(voxels)/volume cerebral total ((voxels)

Quadro 8. Resultados da ressonância magnética de crânio nas não heterozigotas para MPS II (n=18)

Identificação	Volume liquórico (voxels) (n=15)	Volume ventricular (voxels) (n=15)	Volume cerebral (voxels) (n=14)	Volume cerebral normalizado (%) ¹ (n=15)	Caixa craniana (voxel) (n=15)	Volume cerebral (cm ³) (n=14)	Volume liquórico (cm ³) (n=15)	Volume cerebral total (voxel) (n=14)	Volume ventricular (cm ³) (n=15)	Volume liquórico normalizado (%) ² (n=15)	Volume ventricular normalizado (%) ³ (n=15)	Carga de lesões (voxel) (n=14)	Carga de lesões (cm ²) (n=14)	Carga de lesões (%) (n=15)
23	111979	22872	NR	46,78	1853392	NR	147,39	NR	30,11	6,04	1,23	NR	NR	1,08
24	129648	8845	558338	43,12	1906569	1019,44	2509,52	1294904	11,64	6,80	0,46	953	2,67	0,073
25	144453	13548	759578	47,89	2225894	1386,87	190,14	1586143	17,83	6,49	0,61	2360	6,63	0,15
26	72260	5711	640958	44,72	1777926	1170,3	103,75	1433094	8,20	4,06	0,32	4722	13,26	0,33
27	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
28	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
29	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
30	109293	6960	688740	49,17	1934238	1257,53	2545,94	1400714	9,16	5,65	0,36	1305	3,66	0,093
31	60577	17017	684307	46,75	1988568	1249,44	2617,45	1463735	22,40	3,05	0,86	3910	10,98	0,26
32	82384	5328	733387	51,85	1953188	1339,05	2570,88	1414430	7,01	4,22	0,27	1287	3,61	0,09
33	68543	3459	695914	46,60	2069249	1270,63	2723,65	1493249	4,55	3,31	0,17	2113	5,93	0,14
34	161940	6786	680200	46,31	1999971	1241,94	213,15	1437539	8,93	8,10	0,34	2368	6,65	0,16
35	83145	7261	631088	41,96	2076663	1152,27	2733,41	1504019	9,56	4,00	0,35	1208	3,39	0,08
36	156139	5868	622406	44,12	1941216	1136,41	2555,13	1410529	7,72	8,04	0,30	0	0	0
37	128843	3968	686547	51,30	1868003	1253,53	2458,76	1338300	5,22	6,90	0,21	0	0	0
38	141750	5498	707121	45,15	2139749	1291,09	2816,44	1565926	7,24	6,62	0,26	6786	19,06	0,43
39	104078	5638	687237	51,31	1854691	1254,79	2441,24	1339240	7,42	5,61	0,30	977	2,74	0,07
40	217680	13560	670192	43,81	2087178	1223,67	2747,25	1529683	17,85	10,43	0,65	2425	6,81	0,15

NR não realizado; ¹volume craniano (voxels)/volume total(voxels); ² volume ventricular (voxels)/caixa craniana (voxels); ³lesões(voxel)/volume cerebral total (voxel)

Quadro 9. Resultados da tomografia de coluna computadorizada da coluna lombar nas heterozigotas para MPS II (n=22)

Identificação	Resultados (n=15)
1	NR
2	NR
3	NR
4	NR
5	normal
6	NR
7	normal
8	normal
9	normal
10	normal
11	normal
12	normal
13	normal
14	normal
15	normal
16	normal
17	normal
18	normal
19	normal
20	normal
21	NR
22	NR

NR não realizado

Quadro 10. Resultados da tomografia de coluna lombar nas não heterozigotas para MPS II (n=18)

Identificação	Resultados (n=17)
23	normal
25	normal
26	normal
24	normal
27	normal
28	normal
29	normal
30	NR
31	normal
32	normal
33	normal
34	normal
35	normal
36	normal
37	normal
38	normal
39	normal
40	normal

NR não realizado

Quadro 11. Resultados da análise molecular, citogenética e do padrão da inativação do cromossomo X nas heterozigotas para MPS II (n=22)

Identificação	Mutação (n=17)	Cariótipo (n=14)	Número de repetições do alelo HUMARA (pb) (n=14)	Padrão de inativação do cromossomo X (n=10)
1	p.Y103X (exon 3)	NR	198/204	Randômico
2	p.A85T (exon 3)	NR	NR	NR
3	c.1348del13 (exon 9)	NR	NR	NR
4	p.H335R (exon 7)	NR	192/195	Randômico
5	p.K236K (exon 5) splicing	NR	198/216	Randômico
6	p.P231L (exon 5)	NR	198/204	***Desvio do alelo 198
7	*	NR	NR	NR
8	[p.P156Q; p.F155L] (exon 4)	NR	NR	NR
9	p.S333L (exon 7)	46,XX	189/189	Não informativa
10	p.S333L (exon 7)	46,XX	189/189	Não informativa
11	Deeção do gene da <i>IDS</i> e do pseudogene da <i>IDS</i>	46,XX	188/201	Randômico
12	p.Q239X (exon 6)	46,XX	195/201	***Desvio do alelo 196
13	p.R8X (exon1)	46,XX	186/189	Randômico
14	*	46,XX	.	NR
15	p.Q80R (exon 2)	46,XX	192/195	Randômico
16	p.D45V (exon 2)	46,XX	192/198	Randômico
17	p.R88H (exon 3)	46,XX	198/198	Não informativa
18	**	46,XX	189/189	Não informativa
19	*	46,XX	192/207	Randômico
20	**	46,XX	NR	NR
21	inversão entre o gene e pseudogene	46,XX	NR	NR
22	G.374G (exon8) splicing	46,XX	NR	NR

*Mutação não encontrada, mas é heterozigota obrigatória porque tem 2 filhos afetados; **Mutação não encontrada mas é heterozigota obrigatória pela história familiar; NR não realizado; ***Desvio da inativação do cromossomo X quando a amplificação de um dos alelos após a digestão com a enzima Hpa II >80%

Quadro 12. Resultados da análise citogenética e do padrão da inativação do cromossomo X nas não heterozigotas para MPS II (n=18)

Identificação	Cariótipo (n=17)*	Número de repetições do alelo HUMARA (pb) (n=17)	Padrão de inativação do cromossomo X (n=15)
23	46,XX	192/198	Randômico
24	46,XX	NR	NR
25	46,XX	189/198	Randômico
26	46,XX	186/195	Randômico
27	46,XX	189/204	**Desvio do alelo 189
28	46,XX	189/201	Randômico
29	46,XX	189/189	Não informativa
30	46,XX	194/198	**Desvio do alelo 198
31	46,XX	189/201	**Desvio do alelo 198
32	46,XX	189/195	**Desvio do alelo 189
33	46,XX	189/201	**Desvio do alelo 189
34	46,XX	189/204	Randômico
35	46,XX	189/204	**Desvio do alelo 189
36	46,XX	189/204	**Desvio do alelo 189
37	46,XX	188/204	**Desvio do alelo 189
38	NR	189/204	**Desvio do alelo 189
39	46,XX	189/189	Não informativa
40	46,XX	189/199	Randômico

*Cariótipo de sangue periférico foram analisadas 20 células em cultura; NR não realizado; **Desvio da inativação do cromossomo X quando a amplificação de um dos alelos após a digestão com a enzima Hpa II >80%

Quadro 13. Resultados da dosagem da atividade da IDS em plasma, leucócitos e de GAGs urinários nas heterozigotas para MPS II (n=22)

Identificação	IDS plasma * (n=21)	IDS leucócitos** (n=21)	GAGs*** (n=21)
1	70	22	27
2	95	23	23
3	26	44	14
4	16	58	16
5	24	44	21
6	15	87	28
7	33	60	33
8	11	75	16
9	21	48	42
10	38	129	NR
11	20	58	11
12	20	67	17
13	19	54	16
14	20	152	20
15	25	171	13
16	16	88	23
17	NR	NR	11
18	54	130	13
19	16	16	58
20	12	25	101
21	39	202	25
22	74	9	31

*Valores normais de referência 122-463 nmoles/4h por mL; ** Valores normais de referência 31-110 nmoles/4h por mg proteína; ***Valores normais de referência 13-45 mg/mmoL creatinina ; NR não realizado

Quadro 14. Resultados da dosagem da atividade da IDS em plasma, leucócitos e de GAGs urinários nas não heterozigotas para MPS II (n=18)

Identificação	IDS plasma * (n=22)	IDS leucócitos** (n=18)	GAGs*** (n=18)
23	140	54	20
24	225	49	14
25	103	26	35
26	120	25	32
27	51	33	17
28	152	31	17
29	235	62	18
30	299	46	28
31	256	29	25
32	283	55	19
33	227	32	26
34	290	24	38
35	272	45	16
36	238	44	20
37	248	81	22
38	232	46	23
39	178	52	26
40	193	74	35

Valores normais de referência 122-463 nmoles/4h por mL; **Valores normais de referência 31-110 nmoles/4h por mg proteína; *Valores normais de referência 13-45 mg/mmoL creatinina*