

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA MULTIDISCIPLINAR DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**SÍNDROME DE HUNTER EM PACIENTES AMAZONENSES.
PROPOSTA DE ALTERAÇÃO NA ESTRATÉGIA DIAGNÓSTICA E
CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO DA INTERFERÊNCIA DE FATORES
EPIGENÉTICOS NA EXPRESSÃO DO GENE IDS.**

JOSÉ MARIA CABRAL

TESE DE DOUTORADO

MANAUS, AM

2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA MULTIDISCIPLINAR DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**SÍNDROME DE HUNTER EM PACIENTES AMAZONENSES. PROPOSTA DE
ALTERAÇÃO NA ESTRATÉGIA DIAGNÓSTICA E CONTRIBUIÇÃO AO
ESTUDO DA INTERFERÊNCIA DE FATORES EPIGENÉTICOS NA EXPRESSÃO
DO GENE IDS.**

JOSÉ MARIA CABRAL

Tese de Doutorado apresentada ao Programa Multidisciplinar de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Biotecnologia aplicada à Medicina.

Orientador: Prof.^o Doutor Carlos Gustavo Nunes da Silva

MANAUS, AM
2013

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

C117s Cabral, José Maria
Síndrome de Hunter em pacientes amazonenses : proposta de alteração na estratégia diagnóstica e contribuição ao estudo da interferência de fatores epigenéticos na expressão do Gene IDS / José Maria Cabral. 2013
148 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Carlos Gustavo Nunes da Silva
Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Síndrome de Hunter. 2. Mucopolissacaridose. 3. PCR real time. 4. DNA genômico. I. Silva, Carlos Gustavo Nunes da II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA MULTIDISCIPLINAR DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**SÍNDROME DE HUNTER EM PACIENTES AMAZONENSES.
PROPOSTA DE ALTERAÇÃO NA ESTRATÉGIA DIAGNÓSTICA E
CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO DA INTERFERÊNCIA DE FATORES
EPIGENÉTICOS NA EXPRESSÃO DO GENE IDS.**

JOSÉ MARIA CABRAL

ORIENTADOR: PROF.º DOUTOR CARLOS GUSTAVO NUNES DA SILVA

ESTA TESE FOI DEFENDIDA PUBLICAMENTE EM 28/11/2013
E APROVADA PELA BANCA EXAMINADORA COMPOSTA POR:

Prof. Doutor Carlos Gustavo Nunes da Silva
Universidade Federal do Amazonas

Profª Doutora Gislene Almeida Carvalho Zilse
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia

Prof. Doutor Edmar Vaz de Andrade
Universidade Federal do Amazonas

Prof. Doutor Nelson Abrahim Fraiji
Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas
Universidade Federal do Amazonas

Prof. Doutor Jean Jorge Silva de Souza
Universidade Federal do Amazonas
Universidade Nilton Lins

DEDICATÓRIA - HOMENAGEM

Pedaços de uma história simples.

A história começa antes de começar.

Zero ano de idade, 1 ano, 2 anos, 3 anos . . . 22 anos . . . “Doutor”, tratamento diário, corriqueiro, informal, no aconchego familiar. . . Avelino Cabral e Guima Cabral, Meus Pais.

Aos 22 anos a formalidade pública conferida pelo ritual e o diploma . . . Médico. “Doutor” José Maria Cabral . . . Reitor da Universidade Federal de Juiz de Fora – MG.

A vida segue seu rumo . . . 2009, 2010, 2011, 2012, 2013 INPA, UFAM, UNILINS . . . Complicado, trabalhoso, difícil, muito difícil!

“DOUTOR ” Cabral ?

Sim! Finalmente . . . A defesa da tese e a aprovação unânime legitimaram o título.

Obrigado, meus queridos Pais.

Vocês me ensinaram muito do que sei.

Esqueceram de ensinar a conjugar o verbo desistir.

De propósito, se bem os conheço!

AGRADECIMENTOS

Prof. Doutor Carlos Gustavo Nunes da Silva

Aceito o desafio no meio do caminho e usando a simplicidade e a lógica como métodos, o conhecimento profundo e reverenciado corrigiu o rumo, deu forma e consistência e devolveu a confiança. O desfecho ficou ao alcance.

Prof^a Doutora Gislene Almeida Carvalho Zilse

Conciliar a dedicação a experimentos complexos conduzidos em laboratórios primados pela excelência e a sala de aula plural, mantendo o domínio que se exige e a habilidade que se recomenda, é tarefa reservada a poucos. Exemplo de pesquisador e mestre.

Prof. Doutor Luis Eduardo Sarmiento Lozano

Técnicas esmerada e habilidade, rigor e persistência, atributos exigidos na experimentação científica, não estão disponíveis nas publicações indexadas. Dispor dessas virtudes ao alcance de uma palavra ou de um aceno é o sonho acalentado na solidão dos laboratórios. Virou realidade.

Prof^a. Doutora Luciana Leomil

O conhecimento profundo, simplificado em comentário oportuno em meio a uma conversa informal, gerou ideia provocante transformada em argumento desafiador. Ideias novas abrem novos caminhos. Caminhei por eles.

Prof. Doutor José Cardoso Neto

Transformar áridos resultados numéricos de experimentações exaustivas em dados aptos a fundamentar análises, permitir conclusões e gerar novas ideias, é domínio de poucos. O entendimento ficou ao alcance.

Prof. Dr. José Augusto de Castro Carvalho

Decisão pessoal na contramão da maioria, tornou viável conciliar adocência, as obrigações profissionais e familiares e as exigências de um programa de doutorado com prazo de validade. Início da caminhada.

Dra. Solange Costa Novo Cabral

Convivência diária de longos anos fez crescer o amor, o respeito e a admiração pelo que faz, pelo que é. Teria sido muito difícil, quase impossível, sem a dedicação e a entrega. Final feliz.

RESUMO

A Síndrome de Hunter ou Mucopolissacaridose II representa um dos sete tipos de MPSs, doenças de depósito lisossômico inseridas no universo dos erros inatos do metabolismo. Mutações no gene iduronato-2-sulfatase (IDS) causam deficiência da atividade da enzima homônima e definem o acúmulo de GAGs heparan e dermatan sulfato nos lisossomos, levando à disfunção de células, tecidos e órgãos e manifestações clínicas de ampla variedade fenotípica. As medidas da expressão do gene IDS em leucócitos através da PCR em tempo real, avaliadas pelos valores relativos de cDNA, foram baixas em todos os cinco pacientes amazonenses, em testes repetidos, inclusive no indivíduo com clínica sugestiva e sem comprovação bioquímica. O sequenciamento parcial do DNA genômico por escolha do éxon 9, região sede da maioria das mutações em pacientes brasileiros, ao constatar a presença de mutação pontual em todos os pacientes estudados, permitiu questionar o *status* de padrão ouro das dosagens bioquímicas da enzima IDS para o diagnóstico. O emprego da PCR *real time*, via análise de fusão de alta resolução (HRM), mostrou-se útil para a identificação das mulheres portadoras do alelo mutante. Sequenciamento e HRM devem ser inseridos no fluxograma para a confirmação da doença com as vantagens da precisão do diagnóstico precoce e do aconselhamento genético em bases mais científicas. As dosagens plasmáticas de manganês (Mn^{++}) e de vitaminas do complexo B (piridoxina e cobalamina) comprovaram a deficiência desses itens em pacientes e familiares, denunciando carência nutricional. Discute-se a hipótese de que a hipomanganesemia esteja diretamente relacionada à baixa atividade da enzima IDS. As hipovitaminoses B₆ e B₁₂, por sua vez, podem estar relacionadas à hiperhomocistinemia/hipometilação e alterações no padrão de metilação do gene IDS, modificando ainda mais a expressão do gene e definindo quadros fenotípicos múltiplos. Este estudo avança no entendimento dos processos epigenéticos afeitos à síndrome de Hunter e justifica o empreendimento de novas pesquisas, nas quais uma abordagem mais ampla possa validar medidas terapêuticas de baixo custo que se instituídas em idade mais tenra, pré-sintomática, podem revelar-se capazes de modificar a história natural da doença a garantir maior eficiência da terapia enzimática e evolução clínica mais favorável.

Palavras-chave: Hunter. Iduronato-2-sulfatase. Glicosaminoglicanos. Epigenética.

ABSTRACT

Hunter syndrome, or mucopolysaccharidosis II is one of the seven types of MPSs, lysosomal storage diseases inserted in the inborn errors of metabolism universe. Mutations in iduronate-2-sulfatase gene (IDS) cause deficiency of the homonymous enzyme activity and define the accumulation of GAG heparan and dermatan sulfate in the lysosomes, leading to dysfunction of cells, tissues and organs and clinical manifestations of wide phenotypic variety. The measures of the IDS gene expression in leukocytes by PCR in real time relative values evaluated by cDNA, were low in all five patients amazonenses in repeated tests, including in subjects with symptoms suggestive and no biochemical evidence. The partial sequencing of genomic DNA by choice of exon 9, home region of most mutations in Brazilian patients, to verify the presence of point mutation in all patients allowed to question the standard status gold of biochemical measurement of IDS enzyme for diagnosis. The use of PCR real time, via high-resolution melting analysis (HRM), proved to be useful for the identification of women with the mutant allele. Sequencing and HRM should be inserted in the flowchart for the confirmation of the disease with the accuracy of the advantages of early diagnosis and genetic counseling in more scientific basis. Plasma levels of manganese (Mn^{++}) and B vitamins (pyridoxine and cobalamin) proved the deficiency of these items in patients and families, denouncing nutritional deficiency. Discusses the hypothesis that hipomanganesemia is directly related to low activity of IDS enzyme. The hypovitaminosis B_6 and B_{12} , in turn, can be related to hiperhomocistinemia / hypomethylation and changes in the methylation pattern of the IDS gene, further modifying gene expression and phenotypic defining multiple frames. This study advances the understanding of epigenetic accustomed processes to Hunter syndrome and justifies the development of new research in which a broader approach to validate low-cost therapeutic measures that are established in early childhood, pre-symptomatic, may prove to be able to modify the natural history of the disease to ensure greater efficiency of enzyme therapy and more favorable clinical outcome.

Keywords: Hunter. Iduronate -2-sulfatase. Glycosaminoglycans. Epigenetics.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 01. Doenças de depósito lisossômico	5
Figura 02. Diagrama representando a disposição das cadeias de GAGs em um agregado molecular de proteoglicanos (modificado)	7
Figura 03. Corte histológico do tecido conjuntivo frouxo	8
Figura 04. Representação esquemática do tecido conjuntivo frouxo e acúmulo de GAGs nos lisossomos de linfócito T	10
Figura 05. Estrutura primária da isoforma 1 da enzima IDS humana	24
Figura 06. Predição da estrutura secundária da IDS humana	26
Figura 07. Modelo da estrutura terciária da proteína IDS humana (identidade de sequência de 37%)	27
Figura 08. Vias metabólicas de degradação dos GAGs	28
Figura 09. Via de degradação do heparan sulfato.....	29
Figura 10. Via de degradação do dermatan sulfato.....	30
Figura 11. Representação esquemática do cromossoma X	34
Figura 12. Representação esquemática do cromossomo Y	34
Figura 13. Recombinação do IDS e IDS 2	40
Figura 14. Localização das mutações em brasileiros com MPS II.....	42
Figura 15. Fenótipo da paciente com 71 meses de idade	45
Figura 16. Heredograma e foto de uma família sulamericana com indivíduos portadores de Síndrome de Hunter.....	46
Figura 17. Herança recessiva ligada ao cromossomo X – S. de Hunter.....	48
Figura 18. Representação esquemática do ciclo da metionina, ciclo do folato e via da trans-sulfuração	52

Figura 19. Metilação de ilhotas CpG ao longo do genoma.....	54
Figura 20. Metilação progressiva das ilhotas e silenciamento do gene.....	57
Figura 21. Metilação da citosina e desaminação.....	60
Figura 22. Predição da estrutura terciária da IDS humana com a localização do Mn ⁺⁺ no sítio ativo da enzima	63
Figura 23. Prevalência de MPS II na região norte, em 2012.....	77
Figura 24. Diagnóstico de MPS e conduta (modelo atual)	83
Figura 25. Heredograma da família do paciente 1	84
Figura 26. Quantificação da expressão do gene IDS	85
Figura 27. Alinhamento das sequências dos pacientes com a sequência genômica de indivíduos normais pelo programa BLAST.....	87
Figura 28. Facies de dois irmãos. Paciente 1 (à esquerda) com 2 anos e 9 meses de idade, antes de iniciar a TRE. Paciente 2 (à direita) com 2 anos e 10 meses após 31 meses de TRE.....	90
Figura 29. Diagnóstico e conduta – modelo proposto.....	99
Figura 30. Mesmo genótipo – fenótipos diferentes	105
Figura 31. Interferência das hipovitaminoses B ₆ e B ₁₂ nos pacientes.....	109

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 01. Mucopolissacaridoses: Classificação.....	12
---	----

	3
Quadro 02. Mucopolissacaridoses. Tratamento enzimático.....	17
Quadro 03. Perfil mutacional no gene IDS.....	37
Tabela 01. Propriedades das sulfatases da superfamília fosfatase alcalina.....	62
Quadro 04. Sujeitos da pesquisa.....	67
Tabela 02. Oligonucleotídeos utilizados na PCR do gene IDSh	71
Tabela 03. Primers do gene IDSh e temperaturas definidas para o ciclo térmico.....	76
Quadro 05. Dosagens da enzima iduronato 2-sulfatase (em plasma e leucócitos) e dados fenotípicos.....	78
Quadro 06. Resultados e Análise do Éxon IX - Região A.....	95
Quadro 07. Resultados e Análise do Éxon IX - Região B.....	95
Quadro 08. Resultados e Análise do Éxon IX - Região C.....	96
Quadro 09. Resultados e Análise do Éxon VIII.....	97
Quadro 10. Genótipos obtidos do éxon IX do gene IDS através do HRM.....	98
Quadro 11. Dosagens plasmáticas do Mn ⁺⁺ , Vitamina B ₆ e Vitamina B ₁₂	100

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AH - Ácido Hialurônico

ATP - Adenosina Trifosfato

cDNA - Ácido Desoxiribonucleico complementar

CpG - Citosina ligada à Guanidina (*CytosinephosphatoGuanine*)

CREIM - Centro de Referência em Erros Inatos do Metabolismo

CS - Sulfato de condroitina

DCC – Defeitos cardíacos congênitos

DDL - Doenças de depósito lisossômico

DNA - Ácido Desoxiribonucleico

DS - Dermatan sulfato

dsDNA - DNA de fita dupla

ELISA - Técnica imunoenzimática (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*)

GAGs - Glicosaminoglicanos

HRM - Fusão de alta resolução (*High Resolution Melt*)

HS - Heparan sulfato

IDS - Iduronato Sulfatase

IDS_h - Iduronato Sulfatase humana

IEM - Erros Inatos do Metabolismo

kDa - kilodalton

KS - Sulfato de queratan

LEIM – Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo

MEC - Matriz Extracelular

mg - Miligrama

MPS – Mucopolissacaridose; MPS I – Síndrome de Hurley; MPS II - Síndrome de Hunter; MPS III - Síndrome de Sanfilippo; MPS IV - Síndrome de Mórquio; MPS VI - Síndrome de Maroteaux-Lamy; MPS VII - Síndrome de Sly

PCR - Reação em cadeia de Polimerase (*Polymerase Chain Reaction*)

ssDNA - DNA de fita simples

TRE - Terapia de reposição enzimática

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	4
1.1 AS DOENÇAS DE DEPÓSITO LISSOSSÔMICO	4
1.1.1 GENERALIDADES.....	4
1.1.2 LISSOSSOMOS E GLICOAMINOGLICANOS	5

1.1.3 O PAPEL DO TECIDO CONJUNTIVO	8
1.2 MUCOPOLISSACARIDOSES	9
1.2.1 CONCEITO	9
1.2.2 BIOQUÍMICA.....	9
1.2.3 CLASSIFICAÇÃO E EPIDEMIOLOGIA	11
1.2.4 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS.....	13
1.2.5 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL.....	15
1.2.6 TRATAMENTO ENZIMÁTICO.....	16
1.3 MUCOPOLISSACARIDOSE TIPO II OU SÍNDROME DE HUNTER	19
1.3.1 GENERALIDADES.....	19
1.3.2 QUADRO CLÍNICO	20
1.3.3A ENZIMA IDURONATO 2-SULFATASE	23
1.3.3.1 CARACTERIZAÇÃO DA ENZIMA IDURONATO 2-SULFATASE HUMANA.....	23
1.3.3.2 VIAS METABÓLICAS.....	28
1.3.4 DIAGNÓSTICO CLÍNICO E LABORATORIAL	31
1.3.5 GENÉTICA DA MPS II	33
1.3.5.1 OS CROMOSSOMOS SEXUAIS.....	33
1.3.5.2 CARACTERIZAÇÃO DO GENE IDURONATO-2-SULFATASE HUMANO.	36
1.3.5.3 MUTAÇÕES DESCRITAS NO GENE IDURONATO-2-SULFATASE E CORRELAÇÃO GENÓTIPO-FENÓTIPO.....	37
1.3.5.4 MUCOPOLISSACARIDOSE TIPO II EM MULHERES	43
1.3.5.5 EM BUSCA DAS MULHERES HETEROZIGOTAS	45

1.3.5.6 ACONSELHAMENTO GENÉTICO.....	47
1.4 INFLUÊNCIA DE FATORES NUTRICIONAIS NA EXPRESSÃO GÊNICA.....	50
1.4.1 CICLO FISIOLÓGICO DA METIONINA - O PAPEL DA PIRIDOXINA E COBALAMINA NA METILAÇÃO DO DNA	51
1.4.2 HIPOVITAMINOSES B ₆ , B ₁₂ E METILAÇÃO DO DNA.....	54
1.4.3 PADRÃO DE METILAÇÃO DO DNA EM NORMAIS E EM PACIENTES HUNTER	56
1.4.4 MUTAÇÕES TRANSACIONAIS NO GENE IDS.....	59
1.4.5 O MANGANÊS COMO COFATOR DA ENZIMA IDS.....	61
2.OBJETIVOS	65
2.1 OBJETIVO GERAL	65
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	65
3.MATERIAL E MÉTODOS	66
3.1 ASPECTOS ÉTICOS.....	66
3.2 SUJEITOS DA PESQUISA	66
3.3MATERIAL E MÉTODOS EMPREGADOS.....	68
3.3.1 PROTOCOLOS PARA OS ESTUDOS BIOQUÍMICOS	69
3.3.1.1 DOSAGEM DA ENZIMA IDS	69
3.3.1.2 DOSAGEM DAS VITAMINAS B ₆ E B ₁₂	69
3.3.1.3 DOSAGEM DO MANGANÊS	70
3.3.2 PROTOCOLOS PARA OS ESTUDOS EM BIOLOGIA MOLECULAR.....	70
3.3.2.1 EXTRAÇÃO DO RNA.....	71
3.3.2.2 qPCR.....	71
3.3.2.3 EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO PARA HRM.....	72

3.3.2.4 EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO PARA SEQUENCIAMENTO	72
3.3.2.5 SEQUENCIAMENTO DO DNA	73
3.3.2.6 USO DO HIGH RESOLUTION MELTING NA IDENTIFICAÇÃO DE GENÓTIPOS.....	73
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	77
4.1 SÍNDROME DE HUNTER NO AMAZONAS.....	77
4.2 EXPRESSÃO DO GENE IDS.....	85
4.3 SEQUENCIAMENTO DO GENE IDS.....	86
4.4 ANÁLISES DEHRM - HIGH RESOLUTION MELTING	94
4.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS DAS DOSAGENS DE Mn ⁺⁺ , B ₆ E B ₁₂	100
5. CONCLUSÕES.....	113
6.REFERÊNCIAS.....	115

1. INTRODUÇÃO

1.1 AS DOENÇAS DE DEPÓSITO LISSOSSÔMICO

1.1.1 GENERALIDADES

As doenças de depósito lisossômico (DDL) compreendem um grupo heterogêneo de enfermidades genéticas metabólicas caracterizadas pela presença de lisossomos alargados por acúmulo de substrato parcialmente degradado por deficiência na atividade de enzimas catalíticas lisossomais (Wilcox 2004). Estão inseridas na classe de “Erros Inatos do Metabolismo (IEM)” doenças decorrentes de

1.1.2 LISSOSSOMOS E GLICOAMINOGLICANOS

Os lisossomos são organelas citoplasmáticas encontradas tanto em células animais quanto em células vegetais e protozoários (De Duve *et al.* 1955). São extraordinariamente diversos na forma e tamanho e visualizados claramente apenas ao microscópio eletrônico. Em condições fisiológicas contém mais de 50 enzimas - proteases, glicosidases, lipases, nucleases, sulfatases e muitas outras - que catalisam reações de hidrólise em meio ácido (hidrolases ácidas), através das quais promovem a degradação de todos os tipos de macromoléculas, entre as quais se incluem proteínas, hidratos de carbono, lipídios, ácidos nucléicos, glicosaminoglicanos e outras, trazidas do ambiente extracelular e capturadas pelos lisossomos por meio de mecanismos de endocitose, fagocitose e autofagia (Doherty e McMahon 2009; Ravikumar *et al.* 2009).

A degradação intracelular de macromoléculas e de organelas confere aos lisossomos papel fundamental na manutenção da homeostase de células e de tecidos (De Duve 1955; Futerman e van Meer 2004).

Os glicosaminoglicanos, abreviados como GAGs, representam uma classe especial de macromoléculas que sofrem a ação de enzimas lisossomais específicas. Alguns produtos (substratos) representados por moléculas mais simples são eliminados, outros reaproveitados e reciclados pela maquinaria celular (Neufeld e Muenzer 2001; Alves *et al.* 2012). Os GAGs constituem heteropolissacarídeos longos e não ramificados formados por unidades repetitivas de dissacarídeos com os monômeros: N-acetilglicosamida, N-acetilgalactosamina e ácido urômico (ácido D-glicurônico ou L-irudônico) (Esko e Zhang 1996). Os mais importantes, do ponto de vista fisiológico, são o sulfato de dermatan (DS), o sulfato de heparan (HS), o sulfato de condroitina (CS), o sulfato de queratan (KS) e o ácido hialurônico (AH) (Esko *et al.* 2009). São produzidos pelos fibroblastos, as células principais e mais numerosas do tecido conjuntivo, e se distribuem, primariamente, na superfície das células e na matriz extra-celular (MEC). O DS, por exemplo está presente nas estruturas

dérmicas, vasos sanguíneos, válvulas cardíacas, tendões e pulmões, enquanto o HS se distribui nas membranas basais e nas superfícies das células.

A MEC reúne a substância fundamental e fibras colágenas, elásticas e reticulares (colágenas do tipo III), em diferentes combinações, todas sintetizadas pelos fibroblastos. Os GAGs como componentes da substância fundamental encontram-se ligados a proteínas em uma estrutura de alta massa molecular, os proteoglicanos. Um número indefinido de moléculas de proteoglicanos unidas através de proteínas de ligação a moléculas de ácido hialurônico em cadeia, formam agregados moleculares de grande tamanho (figura 2). No detalhe, uma fração da molécula de DS e outra de HS ligadas ao *core* protéico (Esko *et al.* 2009; Ferreira 2011).

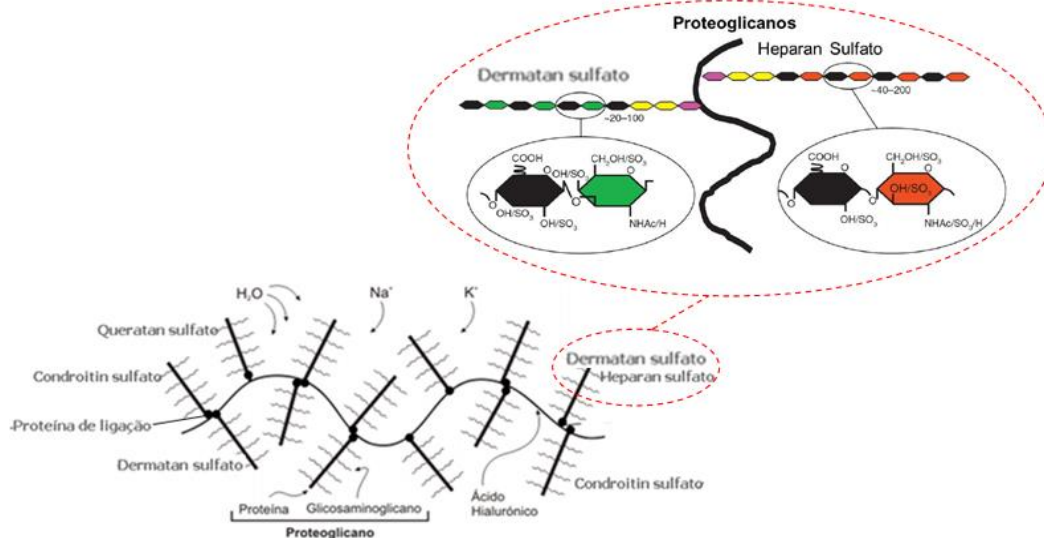


Figura 2. Diagrama representando a disposição das cadeias de GAGs em um agregado molecular de proteoglicanos (modificado).

Fonte: <http://acd.ufrj.br/labnac/gags.htm>; www.bdttd.unifesp.br/tede/.

Os grupos sulfato dos GAGs garantem a esses complexos numerosas cargas negativas capazes de reter cátions Na^+ e K^+ e moléculas de água para a camada de solvatação. Este comportamento altamente hidrofílico traduz uma característica líquida ou mucosa (muco) aos GAGs, consagrando o termo mucopolissacarídeos, outra denominação dos GAGs.

As moléculas de GAGs ao serem liberadas dos proteoglicanos através da clivagem proteolítica, entram nos lisossomas para a digestão intracelular seguindo quatro vias diferentes, dependendo do tipo de molécula a ser degradada. O processo de digestão intralissossomal progressivo requer a ação em sequência de 10

enzimas diferentes: quatro glicosidases, cinco sulfatases e uma transferase não hidrolítica. Essas enzimas lisossomais catalisam e transformam as moléculas de GAGs em substratos os quais são eliminados ou retornam ao metabolismo celular (Neufeld e Muenzer 2001; Alves *et al.* 2012).

A enzima Iduronato-2-sulfatase ou I2S (Bach *et al.* 1973) atua na primeira fase do catabolismo dos GAGs dermatan sulfato e heparan sulfato, ao promover a hidrólise dos grupos 2-sulfato das unidades de L –iduronato 2-sulfato que estão presentes nessas macromoléculas. Esta reação constitui o início do processamento dos GAGs, sem a qual não ocorrem as demais reações enzimáticas em cadeia promovidas por outras hidrolases lisossomais (Neufeld e Muenzer 2001).

1.1.3 O PAPEL DO TECIDO CONJUNTIVO

A denominação peculiar “conjuntivo ou conectivo”, dá a dimensão funcional desse tipo de tecido orgânico responsável por unir, nutrir, proteger, preencher os espaços e fazer a ligação entre tecidos e órgãos, de modo a dar sustentação e forma.

O tecido conjuntivo propriamente dito (Fig. 3) encontra-se distribuído amplamente por todo o organismo, exceto no cérebro e medula espinhal.

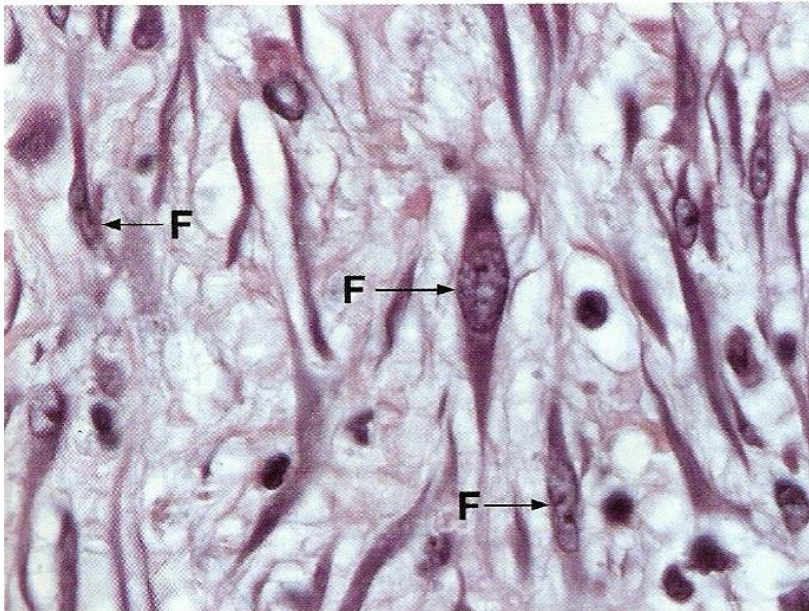


Figura 3. Corte histológico do tecido conjuntivo frouxo mostrando vários fibroblastos, fibrócitos e fibras. Fibroblastos, ao contrário de fibrócitos, têm intensa atividade metabólica, núcleos mais grossos, citoplasma abundante e muitos prolongamentos.

Fonte: <http://www.infoescola.com/biologia/tecido-conjuntivo/>. Acesso em: 31 de maio de 2010.

O tecido conjuntivo frouxo (mais rico em células e menor quantidade de fibras colágenas) preenche espaços não ocupados no interior de tecidos, entre tecidos e entre órgãos, sustenta e nutre epitélios de revestimento e glandulares, envolve nervos, vasos sanguíneos e linfáticos e faz parte da estrutura de muitos órgãos. O tecido conjuntivo denso (mais pobre em células e mais abundante em fibrascolágenas, elásticas e reticulares)forma cápsulas protetoras ao redor de órgãos como o fígado, as fâscias de contenção e separação de músculos esqueléticos, os tendões e ligamentos que conectam músculos esqueléticos e ossos e o revestimento dos grandes vasos sanguíneos.

Dada a riqueza de GAGs na substância fundamental da MEC depreende-se que a queda da atividade enzimática de alguma hidrolase lisossômica abaixo do nível crítico,ao impedir a degradação dessas macromoléculas, leva ao acúmulo do substrato não degradado em lisossomos, comprometendo a função de célulasdo tecido conjuntivo em praticamente todo o organismo (Pearse e Smith 2000; Janvier e Bonifacino 2005; Hopwood e Brooks 1997; Parkinson-Lawrence*et al.* 2010).Ao danificar células em uma multiplicidade de órgãos, aparelhos e sistemas, define quadros clínicos variados de doenças graves agrupadas como erros inatos do metabolismo, entre as quais as mucopolissacaridoses merecem destaque.

Os demais tipos de tecido conjuntivo que se diferenciam pela variedade morfológica celular e especialização funcional (ósseo, cartilaginoso, sanguíneo e adiposo), estão sujeitos ao mesmo fenômeno, expandindo a variabilidade clínica.

1.2MUCOPOLISSACARIDOSES

1.2.1 CONCEITO

Mucopolissacaridoses (MPSs) são doenças decorrentes da deficiência de enzimas que catalisam a hidrólise de glicoaminoglicanos, com armazenamento progressivo intralisossomal desses subprodutos, levando à disfunção de células, tecidos e órgãos e sintomatologia multissistêmica e polimórfica (Neufeld e Muenzer 2001). O acúmulo desses substratos constitui a base bioquímica das MPSs.

1.2.2 BIOQUÍMICA

A bioquímica das MPSs está relacionada a alterações no metabolismo de proteoglicanos GAGs. Na falta de atividade de hidrolases lisossomais, o bloqueio do catabolismo de moléculas de GAGs determina o acúmulo de produtos não degradados dentro dos lisossomas das células, resultando na disfunção de tecidos e órgãos em todo o organismo e excreção aumentada na urina (Neufeld e Muenzer 2001). O acúmulo diversificado justifica o amplo e variável espectro clínico observado em vários pacientes. A Figura 4 reproduz um linfócito de um portador de MPS, visto ao microscópio eletrônico; os lisossomos aumentam de volume e adquirem forma arredondada devido ao acúmulo de GAGs.

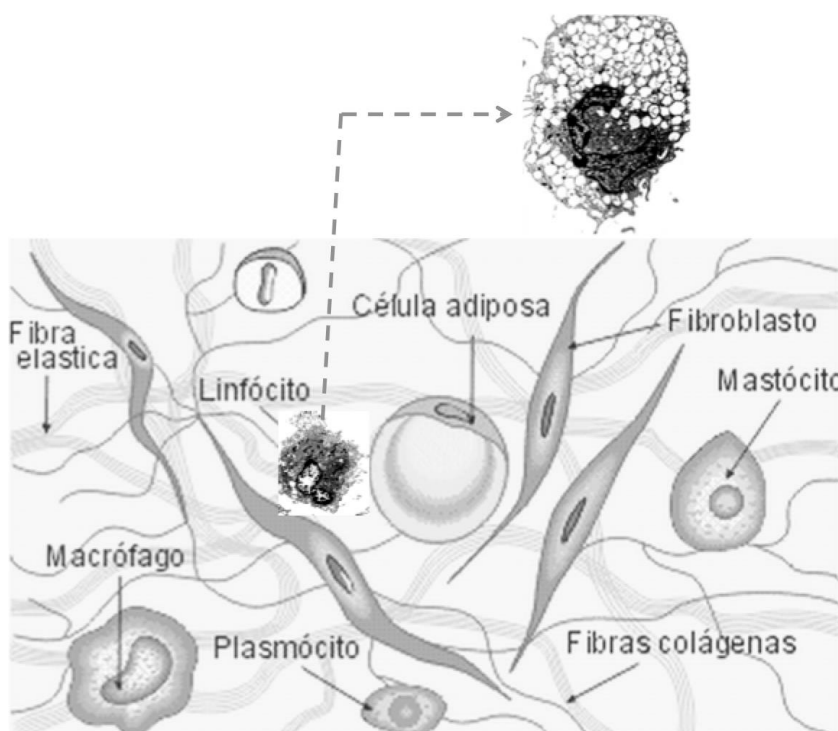


Figura 4. Representação esquemática do tecido conjuntivo frouxo, um linfócito T normal e outro com acúmulo de GAGs nos lisossomos.

Fonte: 2.bp.blogspot.com; Bond *et al.* (1997); Swiedler *et al.* (2005).

O acúmulo de GAGs pode comprometer a funcionalidade de órgãos por outros mecanismos, ao interferir nas funções de outras proteínas dentro dos lisossomos e

interromper o trânsito de moléculas no interior da célula. Embora se considere que o principal defeito nas mucopolissacaridoses seja o armazenamento de GAGs nos lisossomos, outros fatores como a autofagocitose, apoptose, inflamação e diminuição da neurotransmissão têm sido implicados na patologia devastadora observada nesta classe de doenças. A via autofágica está presente na patogênese de outras desordens de armazenagem lisossomal, incluindo a deficiência múltipla de sulfatase, mucopolisacaridoses e outras (Jennings *et al.* 2006; Kiselyov *et al.* 2007; Settembre *et al.* 2008). A ativação da autofagia pode representar um mecanismo de resposta comum por células afetadas, tentando capturar e limpar o substrato não degradado. A acumulação secundária de gangliosídeos no cérebro de pacientes afetados (Buchino e Vogler 1998) tem sido postulada como um fator causal na neuropatologia (Jones *et al.* 1997).

Outros defeitos genéticos relacionados às proteínas intervêm no processo de pós-tradução, localização na organela e capacitação funcional. Em todas as hipóteses, haverá o acúmulo intralisossomal do substrato (Scriver *et al.* 2001).

1.2.3 CLASSIFICAÇÃO E EPIDEMIOLOGIA

Os mecanismos de herança das MPSs envolvem o modo autossômico recessivo, exceto para a MPS II ou Síndrome de Hunter, a única com a recessividade ligada ao cromossomo X (Neufeld e Muenzer 2001). As mutações não silenciosas em genes específicos levam a deficiências na ação enzimática e definem os quadros clínicos das MPSs. Onze diferentes enzimas estão envolvidas na degradação gradual de glicosaminoglicanos ou mucopolissacarídeos, denominação em desuso que deu nome às doenças. As deficiências de cada uma dessas enzimas resultam em sete tipos diferentes de MPS descritas até o momento, assim designadas: I, II, III, IV, VI, VII e IX (Quadro 1). Subtipos foram descritos para a MPS III (A, B, C e D) e IV (A e B) (Neufeld e Muenzer 2001; Giugliani *et al.* 2011).

O Quadro 1 relaciona os genes estruturais codificadores, as enzimas lisossomais deficientes e os produtos acumulados. Curiosamente, as designações MPS V e MPS VIII são mantidas no quadro, embora não representem entidades clínicas, conforme será mostrado adiante.

Quadro 1. Mucopolissacaridoses - Classificação.

Tipo	Síndrome/ Epônimo	Gene	Locus	Deficiência Enzimática	Produtos Acumulados
MPS IH	Hurler	IDUA	4p16.3	α -L-iduronidase	DS, HS
MPS IH/S	Hurler Scheie				
MPS IS	Scheie				
MPS II A	Hunter severo	IDS	Xq28	Iduronato-2-sulfatase	DS, HS
MPS II B	Hunter Atenuado				
MPS IIIA	Sanfilippo A	SGSH	17q25.3	Heparan N-sulfatase	HS
MPS IIIB	Sanfilippo B	NAGLU	17q21.2	α -N-acetil-d-glucosaminidase	
MPS IIIC	Sanfilippo C	HGSNAT	8p11.21	AcetilCoA: α -glucosaminide- acetiltransferase	
HSMPS IIID	Sanfilippo D	GNS	12q14.13	N-acetilglucosamine-6- sulfatase	
MPS IVA	Morquio A	GALNS	16q24.3	Galactose-6-sulfatase	KS, CS
MPS IVB	Morquio B	GLB1	3p22.3	β -Galactosidase	KS
MPS V					
MPS VI	Maroteaux- Lamy	ARSB	5q14.11	N-acetilgalactosamine-4- sulfatase (arilsulfatase B)	DS
MPS VII	Sly	GUSB	7q11.21	β -Glucuronidase	DS, HS, CS
MPS VIII					
MPS IX	Natowicz	HYAL1	3p21.31	Hialuronidase 1	AH

Fonte: Young e Harper 1982; Nelson 1997; Poorthuis *et al.* 1999; Nelson *et al.* 2003; Vieira *et al.* 2008; National Institute of Neurological Disorders and Stroke.

De acordo com estudos internacionais, a incidência das MPSs em bloco varia de 1.9 a 4.5: 100.000 nascimentos (Nelson 1997; Meikle *et al.* 1999; Poorthuis *et al.* 1999; Applegarth *et al.* 2000; Nelson *et al.* 2003; Baehner *et al.* 2005). Os dados epidemiológicos publicados não contemplam todos os tipos de MPS ou se

limitam a um tipo determinado em populações específicas. Por exemplo, uma alta prevalência para MPSII foi relatada em Israel (1:34 000 nascimentos) (Schaap e Bach 1980) e de MPSIV na Irlanda do Norte (1:75 000 nascimentos) (Nelson 1997) e nos Países Baixos (1:73 000 nascimentos) (Poorthuis *et al.* 1999). A MPSVII é extremamente rara, provavelmente em consequência de sua letalidade fetal ou neonatal (Neufeld e Muenzer 2001). O mesmo parece ser verdadeiro para MPSIX, para a qual apenas um caso solitário foi relatado (Natowicz *et al.* 1996) até a presente data. As MPSs são, portanto, doenças de rara ocorrência, mas se presume que a incidência seja bem maior do que se tem suspeitado. Os dados relativos à incidência das MPSs no Brasil não são completamente conhecidos (Schwartz e Boy 2011). A Rede MPS Brasil, uma iniciativa para facilitar o diagnóstico e o tratamento das doenças MPS no Brasil (www.redempsbrasil.ufrgs.br), através do Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo sediado no Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (SGM/HCPA), divulgou o número de casos diagnosticados desde 1982 (ano de início das suas atividades) até junho de 2010: 892 casos. Os tipos mais frequentes foram as MPS I, II e VI, para os quais já existe terapia de reposição enzimática (TRE). Em 2012, a Rede MPS Brasil divulgou novos números de pacientes brasileiros com MPS, cadastrados até junho de 2012. Do total de 983 pacientes, 194 com MPS I, 292 com MPS II, 134 com MPS III (MPS IIIA: 37; IIIB: 68; IIIC: 29; IIID: 0), 113 com MPS IVA, 8 MPS IV B, 230 com MPS VI e 12 com MPS VII (Brusius Facchin 2012).

1.2.4 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

As MPS são doenças de envolvimento multissistêmico, polimórfico e de alta morbimortalidade, caracterizadas por um curso crônico e progressivo, com diferentes graus de severidade. Compartilham uma série de características clínicas que incluem fácies dismórfica (aspecto grosseiro), disostose múltipla (alterações ósseas e articulares), mobilidade articular limitada, baixa estatura, organomegalia (hepatomegalia e/ou esplenomegalia) e hérnias abdominais. Dependendo do tipo e subtipo da MPS, pode haver comprometimento do sistema nervoso central, do aparelho auditivo e ocular, do aparelho cardiovascular e funcionamento das vias aéreas. A sobreposição de muitos sinais e sintomas dificulta o reconhecimento clínico de um dado tipo de MPS (Neufeld e Muenzer 2001; Dieter 2006; Vieira 2007;

Giugliani *et al.* 2010; Filocamo *et al.* 2011; Alves *et al.* 2012; Martins 2013; Michelletti e Martins 2013).

O quadro clínico se estabelece na medida do acúmulo de produtos parcialmente degradados. Trabalho publicado em 2008 por Giugliani *et al.* reunindo pacientes brasileiros, revela que a idade média no início dos sinais / sintomas foi de 18 meses (MPS I: 18, MPS II: 24, MPS IVA: 8, MPS VI: 8). Alterações esqueléticas encontradas nas MPS IVA e VI, contraturas articulares na MPS II e características faciais típicas na MPS I, foram os achados iniciais mais frequentes (Giugliani *et al.* 2008).

As manifestações clínicas detalhadas de cada tipo de MPS e as taxas de incidência constam do Anexo 1.

A designação MPS V não se sustentou. O fenótipo caracterizado por rigidez articular, turvação da córnea, regurgitação aórtica, pouco ou nenhum comprometimento da inteligência e sobrevida até a idade adulta, tratava-se de uma forma mais suave de MPS I (Síndrome de Scheie), causada por deficiências no α -L-iduronidase (McKusick *et al.* 1965).

A entidade clínica designada MPS VIII foi descrita no final de 1970 em um único paciente, uma criança de 5 anos de idade que exibia baixa estatura, cabelo espesso, hepatomegalia, disostose múltipla leve, retardo mental, sem sinais de opacificação da córnea (Ginsburg *et al.* 1977; Ginsburg *et al.* 1978). As análises bioquímicas revelaram aumento da excreção urinária de queratan e heparan sulfato e deficiência plasmática de duas hexosaminas sulfatases. No entanto, análises laboratoriais posteriores não confirmaram esses achados e a designação MPS VIII foi abandonada (Di Ferrante 1980; Alves *et al.* 2012). A Mucopolissacaridose IX foi inicialmente descrita por Natowicz *et al.* (1996) em uma menina de 14 anos de idade, com baixa estatura e múltiplas massas em tecidos periarticulares. A análise radiográfica mostrou nódulos sinoviais, erosões acetabulares e um cisto poplíteo. Foi evidenciada a presença de depósito lisossômico de ácido hialurônico dentro dos macrófagos e fibroblastos das massas biopsiadas e concentrações séricas elevadas (38 a 90 vezes). As descrições de deficiência de hialuronidase nesta família são consistentes com herança autossômica recessiva. Esta doença de armazenamento de ácido hialurônico devido à deficiência genética de hialuronidase é causada por mutações no gene HYAL1 (Csoka *et al.* 2001). Atualmente, outros três genes relacionados à hialuronidase (HYAL4, HYALP1, SPAM1) foram identificados no

cromossomo 7q31.3. Estes genes codificam as hialuronidasas e as endoglicosidasas que iniciam a degradação de HA (Martin *et al.* 2008).

1.2.5 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

Frente à suspeita clínica de MPS, deve-se realizar a análise dos GAGs urinários através da dosagem e/ou cromatografia/eletroforese (Quadro 1). Resultados negativos, praticamente, descartam o diagnóstico. Ao contrário, a presença pode confirmar MPS, mas não distingue o tipo, uma vez que os achados não são específicos, exceto para a raríssima MPS IX (Neufeld e Muenzer 2001). O excesso de heparan sulfato e de dermatan sulfato na urina sugere o diagnóstico de MPS II, mas não descarta a MPS I (Síndromes de Hurler/Scheie) (Neufeld e Muenzer 2001). Resultados falso-negativos e falso-positivos podem ser obtidos. Uma incidência relativamente alta de falso-negativo foi relatada para o sulfato de heparan em pacientes com MPS III e com fenótipos clínicos leves / médio. Além disso, o sulfato de keratan não forma um produto de reação com qualquer um dos métodos usados rotineiramente. A técnica imunoenzimática (ELISA) foi mostrada para quantificar, com precisão, KS na urina e no sangue em pacientes com síndrome de Morquio tipo IVA (Tomatsu *et al.* 2004).

De acordo com o tipo de GAG abundante na urina procede-se à medida da atividade da enzima considerada. O método fluorimétrico (Voznyiet *al.* 2001) utiliza fibroblastos cultivados ou sangue heparinizado para a quantificação da enzima em leucócitos e plasma. A redução significativa da atividade de determinada enzima permite o estabelecimento do diagnóstico bioquímico, aceito atualmente como diagnóstico definitivo do tipo de MPS.

Durante a última década, a tecnologia de ponto de sangue seco foi introduzida para ensaios enzimáticos, facilitando a logística de transporte ao laboratório, diminuindo os custos e abrindo a possibilidade de atender grandes populações. A escolha do material orgânico depende da preferência do pesquisador e da facilidade técnica (Neufeld e Muenzer 2001; Alves *et al.* 2012). No entanto, é recomendável a confirmação, em plasma, leucócitos ou fibroblastos, dos resultados positivos baseados na análise em papel-filtro.

Os estudos de biologia molecular iniciados na década de 1990 tem permitido a identificação dos genes que codificam as enzimas lisossomais envolvidas nas vias

de degradação de GAGs. As mutações desses genes de interesse levam a menor expressão do RNAm no tecido conjuntivo, resultando na deficiência da atividade da enzima lisossomal. A grande variedade de mutações responsáveis por qualquer uma das MPS não permite o estabelecimento de uma correlação genótipo-fenótipo. Mesmo no contexto de uma mutação recorrente, alguns pacientes portadores de uma mesma alteração podem se apresentar com diferentes fenótipos clínicos, sugerindo que a heterogeneidade alélica (por exemplo, outras variantes em loci de outros genes, fatores ambientais) pode servir para modular o fenótipo clínico (Neufeld e Muenzer 2001).

O diagnóstico pré-natal é possível, seja pela dosagem de GAGs no líquido amniótico, pela medida da atividade enzimática específica em vilosidades coriônicas ou amniócitos ou pela análise de DNA. Recomenda-se sempre a utilização de mais de um método para confirmação dos resultados.

1.2.6 TRATAMENTO ENZIMÁTICO

A indústria farmacêutica inovadora, usando técnicas de engenharia genética, desenvolve biofármacos destinadas ao tratamento das doenças e afecções graves e raras. O portfólio desse tipo de empresa compreende vários produtos já aprovados pelas agências reguladoras e diversos outros em fase de avaliação pré-clínica e clínica. A BioMarin Pharmaceutical Inc. desenvolveu e produz duas terapias de reposição enzimática aprovadas pela FDA e pela ANVISA para tratamento de MPS I e MPS VI. O Naglazyme[®] (galsulfase), para MPS VI, é comercializado pela BioMarin enquanto o Aldurazyme[®] (laronidase), para MPS I, é comercializado pela Genzyme Corporation. Em comunicado de 01 de fevereiro de 2011, a BioMarin anunciou o início da fase 3 sobre o uso da enzima N-acetilgalactosamina 6-sulfatase (GALNS ou BMN 110) destinada ao tratamento da mucopolissacaridose tipo IV-A ou Síndrome de Morquio A. Este estudo está sendo realizado em cerca de 40 centros espalhados pelo mundo, incluindo Brasil, Japão, Taiwan, a maioria dos países da Europa Ocidental, Canadá e EUA, com a inclusão de, aproximadamente, 160 pacientes. O único caso de MPS IVA diagnosticado no Amazonas, infelizmente não foi incluído por questões sócio-familiares (Giugliani *et al.* 2010). A idursulfase é a enzima destinada ao tratamento de pacientes portadores da Síndrome de Hunter. Trata-se de um recombinante da proteína iduronato-2-sulfatase produzido em células

humanas, fabricado pela Shire Human Genetic Therapies, Inc. (Alewife Brook Parkway, 205. Cambridge, MA 02138. USA) e comercializado como Elaprase™ em frascos de 6 mg/3 ml de solução (2 mg/ml). O Brasil foi um dos principais centros participantes das fases II e III de emprego da idursulfase. Dos 96 pacientes que participaram dos estudos, 19 eram brasileiros. Embora fosse utilizado por pacientes em mais de 40 países, apenas em maio de 2008 recebeu a aprovação da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) para uso e comercialização no Brasil (Giugliani *et al.* 2010; ANVISA 2011).

O Quadro 02 mostra as enzimas disponíveis atualmente no mercado e as doses semanais recomendadas pelos estudos científicos.

Quadro 2. Mucopolissacaridoses – Tratamento enzimático.

MPS	Enzima	Fabricante	Apresentação	Dose semanal
MPS I – Hurler	Aldurazyme (Laronidase)	GENZYME Corporation	frc 2,9 mg/5 mL (0,58 mg/mL)	0,58 mg/kg peso
MPS II – Hunter	Elaprase (Idursulfase)	SHIRE HGT	frc 6 mg/3mL (2 mg/mL)	0,5 mg/kg peso
MPS VI – Maroteaux-Lamy	Naglazyme (Galsulfase)	BIOMARIN Pharmaceuticals	frc 5 mg/5 mL (1 mg/mL)	1,0 mg/kg peso

Fonte: adaptado de Giugliani *et al.* 2010; Schwartz *et al.* 2011; ANVISA 2011.

As doses calculadas são diluídas em 100 a 250 ml de soro fisiológico a 9% para administração intravenosa contínua, utilizando bomba de infusão, em periodicidade semanal.

A instituição precoce da TRE pode mudar a história natural da doença, favorecendo o paciente. O aumento da conscientização dos profissionais de saúde sobre esse grupo de doenças e o acesso facilitado aos testes diagnósticos pode reduzir o tempo de atraso para o diagnóstico (Giugliani *et al.* 2008).

Um grupo de especialistas brasileiros, por iniciativa do Prof. Dr. Roberto Giugliani – Departamento de Genética da UFRGS, definiu as indicações para o tratamento enzimático das MPSs I, II e VI (Giugliani R, Vieira T, Cabral JM, Santos ES, Correa Neto J, Martins AM, *et al.* 2010). Particularizando a Síndrome de Hunter, a TRE deve ser indicada para pacientes sintomáticos de qualquer idade, que apresentem pelo menos uma manifestação clínica que responda ao tratamento, tais como: a) doenças respiratórias como obstruções de vias aéreas superiores, infecções de repetição, doenças restritivas; b) comprometimento osteoarticular que prejudique

ou dificulte a locomoção e torne o paciente dependente de outras pessoas para a realização de atividades diárias; c) apneia do sono com frequência maior que 1 evento/hora para pacientes menores de 18 anos e maior que 5 eventos/hora para adultos; d) saturação média de O₂ noturno < 92% em crianças e < 85% em adultos.

Os benefícios do tratamento são questionáveis em pacientes que apresentam grave comprometimento das funções cognitivas, já que a enzima administrada por via intravenosa não atravessa a barreira hematoencefálica. No entender de Wraith *et al.* (2008), mesmo os pacientes com importante envolvimento do SNC devem receber TRE por 12 a 18 meses, e reavaliados ao final desse período.

Para os portadores de MPS I, MPS II e MPS IIIA, estão sendo conduzidos estudos de administração direta da enzima no cérebro através de injeções intratecais, visando recuperar o déficit cognitivo (Dickson e Chen 2011; Alves *et al.* 2012).

O caráter multissistêmico e evolutivo das MPSs em geral exige que os pacientes sejam acompanhados por equipe multidisciplinar (Schwartz e Boy 2011).

1.3 MUCOPOLISSACARIDOSE TIPO II (MPS II) OU SÍNDROME DE HUNTER

1.3.1 GENERALIDADES

A Síndrome de Hunter, classificada como MPS II, é uma doença de depósito lisossômico com herança de caráter recessivo ligada ao cromossomo X. Em decorrência da hemizigotia para os *loci* do cromossoma X, a doença é relatada,

quase exclusivamente, nos indivíduos do sexo masculino. Mutações heterogêneas no único alelo do gene iduronato-2-sulfatase (IDS, I2Sh ou IDSh), que codifica para a enzima L-iduronato 2-sulfato sulfatase humana, pode alterar a expressão desse gene (Bach *et al.* 1973). A atividade deficiente da enzima IDS impossibilita a reação inicial do processo catalítico fisiológico de digestão em cascata dos glicosaminoglicanos heparan sulfato e dermatan sulfato.

A primeira descrição da síndrome foi feita por Charles Hunter em 1917 ao examinar dois irmãos de oito e dez anos de idade. Ambos apresentavam, alterações morfológicas e funcionais marcantes envolvendo vários aparelhos e sistemas, com grande similaridade (Hunter 1917). Este fato permitiu deduzir o caráter hereditário da enfermidade.

Abordagens distintas têm apresentado números variáveis de incidência global da doença. Segundo os dados publicados por Zlotogora *et al.* (1991) e Ben-Simon-Schiff *et al.* (1994), a incidência de MPS II na população em geral é da ordem de 1: 340.000 recém-nascidos do sexo masculino. Entre os judeus Ashkenazi da Europa Central e Oriental e os judeus Sefarditas que vivem em Israel, a incidência é de aproximadamente 1 para cada 170.000 meninos nascidos vivos. Segundo Schaap e Bach (1980) é bem maior e atinge 1:34 000 nascimentos. Não resta dúvida quanto a alta incidência nessas populações (Baehner *et al.* 2005). Outros autores (Nelson *et al.* 2003) estimam uma incidência de aproximadamente 1:110.000 e 132.500 nascidos vivos. No Brasil, inexitem dados epidemiológicos precisos, mas segundo resultados divulgados pela Rede MPS Brasil, a Síndrome de Hunter é a mais frequentemente diagnosticada em nosso país (Giugliani *et al.* 2008).

1.3.2 QUADRO CLÍNICO

A MPS II é doença crônica de envolvimento multissistêmico. O caráter progressivo traduzido pela intensificação dos sinais e sintomas está na dependência do acúmulo lisossômico dos GAGs heparan e dermatan sulfato nas células do tecido conjuntivo em geral (Neufeld e Muenzer 2001).

O Anexo 01 sumariza os achados clínicos e permite verificar a similaridade com as demais síndromes. Importante destacar que a opacificação da córnea não

está presente na forma ligada ao X, ao contrário das outras formas autossômicas não ligadas ao X (Young *et al.* 1982; Wraith *et al.* 2008; Martin *et al.* 2008).

Classicamente, a síndrome de Hunter compreende duas entidades clínicas reconhecidas de acordo com a gravidade dos sintomas: atenuada (leve) e grave. Esta classificação de MPS remonta a 1972, quando McKusick distinguiu a forma grave (que chamou de MPS IIA), com comprometimento do SNC, deficiência física e óbito precoce, e a forma leve (chamado MPS IIB) na qual o SNC é minimamente afetado ou não, e a sobrevivência atinge a idade adulta. Na MPS II-A, existe atraso de desenvolvimento e/ou deterioração cognitiva progressiva com retardamento mental e demência. As crises convulsivas (Martin *et al.* 2008), quando presentes, manifestam-se no início do quadro neurodegenerativo. Alterações de comportamento, como hiperatividade, agressividade e obstinação também podem estar presentes em pacientes mais gravemente afetados (Martin *et al.* 2008). Na forma atenuada, a capacidade de raciocínio lógico é minimamente deficiente. Hidrocefalia comunicante e síndrome de compressão da medula espinhal, além da síndrome do túnel do carpo, também podem ocorrer (Martin *et al.* 2008). O fenótipo severo pode ser três vezes mais prevalente que o atenuado (Young *et al.* 1983), mas nenhuma explicação científica para o fato foi relatada até o momento.

Nos estudos conduzidos por Young e Harper (1982 e 1983), a idade de início dos sinais e sintomas foi de 4,3 anos na forma atenuada e 2,5 anos na forma grave.

Outros autores (Frossairt *et al.* 2002; Sanjurjo-Crespo 2007) confirmam que nas formas graves o quadro tem início mais precoce que nas formas atenuadas. As dificuldades respiratórias, obstrução progressiva de vias aéreas superiores e compressão da coluna vertebral, estão entre outros sinais e sintomas iniciais.

No estudo retrospectivo publicado por Giugliani *et al.* (2008), a idade média de início do quadro clínico e a idade média de diagnóstico bioquímico em pacientes sulamericanos foi de 3,2 e 14 anos, respectivamente, para os pacientes com a forma atenuada, e 2 e 7 anos para os pacientes com a forma grave. As contraturas articulares, macrocefalia, alterações faciais e o aumento do volume abdominal devido à hepatoesplenomegalia, foram os achados iniciais mais frequentes.

Nas formas graves a progressão é rápida com deficiência física progressiva e óbito entre os 10 e 15 anos, na maioria dos casos (Muenzer *et al.* 2009). Entre as

causas mais comuns de morte estão a doença obstrutiva das vias aéreas e insuficiência cardíaca devido à disfunção valvar, hipertensão pulmonar e doença do miocárdio (Neufeld e Muenzer 2001; Young e Harper 1983; Beck 2011). Ao contrário, nas formas atenuadas a progressão da doença é mais lenta, e a expectativa de vida oscila entre 20 e 60 anos (Muenzer *et al* 2009). Existe registro de capacidade reprodutiva (DiFerrante e Nichols 1972).

Embora amplamente utilizada, a nomenclatura que separa as duas formas clínicas recebe críticas, uma vez que representam os dois extremos de um espectro amplo e contínuo de gravidade clínica. Além disso, em termos de deficiência da enzima, são indistinguíveis (Neufeld e Muenzer 2001). Wraith *et al.* (2008) defenderam que a MPS II deveria ser considerada um *continuum* fenotípico entre os dois extremos.

O início das manifestações clínicas, a velocidade de instalação, a intensidade do quadro e a multiplicidade clínica, variam muito entre as pessoas afetadas (Meikle *et al.* 1999; Poorthuis *et al.* 1999; Alves *et al.* 2012). O quadro clínico para os pacientes mais gravemente afetados é relativamente previsível.

À semelhança do que ocorre em muitas enfermidades, especialmente as genéticas, os portadores da síndrome de Hunter muito se assemelham no aspecto físico geral. Os traços faciais são grosseiros. Exibem macrocefalia (devido à hidrocefalia), com a parte da frente da cabeça proeminente, face arredondada, macroglossia e lábios grossos, dentes hipoplásicos e espaçados. O nariz é amplo e a ponte nasal aplanada. A baixa estatura severa, limitada a 1,40 m, é achado obrigatório em todos os pacientes, mesmo naqueles submetidos à terapia enzimática continuada com idursulfase e constitui um dado clínico relevante. O tórax fica rígido e deformado pelas alterações das articulações condro-esternais. A hepatomegalia, associada ou não à esplenomegalia (Wraith *et al.* 2008), abaula o abdome e favorece as hérnias umbilicais e inguinais (Martin *et al.* 2008; Sanjurjo-Crespo *et al.* 2008; Schumacher *et al.* 2008). Além do mais, provoca elevação do diafragma, dificulta a expansibilidade torácica e a aeração pulmonar, facilita o acúmulo de secreção nas bases dos pulmões e predispõe às infecções respiratórias de repetição (Martin *et al.* 2008). A respiração é difícil e ruidosa, mesmo sem infecção das vias aéreas. Mais tardiamente, a traquéia pode estreitar-se pelo depósito de GAG. A apneia do sono é outra complicação frequente que também ocorre em outras MPSs (Sanjurjo-Crespo 2007; Martin *et al.* 2008; Wraith *et al.* 2008). Os pacientes apresentam otite de repetição e praticamente todos terão algum grau de perda

auditiva. As mãos são grossas e os dedos rígidos (mãos em garra). Outras alterações musculoesqueléticas, podem estar presentes como a displasia pélvica e alterações em vértebras e costelas (Sanjurjo-Crespo 2007). As pernas curtas e deformadas, os joelhos levemente flexionados pelo enrijecimento articular e a cifose conferem uma maneira característica de manter-se de pé e de caminhar. Alguns pacientes caminham sobre os artelhos devido ao encurtamento do tendão de Aquiles. Todos os movimentos corporais ficam limitados pelo comprometimento articular generalizado. As deformidades ósseas caracterizam a chamada disostose múltipla e revelam alterações específicas em vários ossos. (Young *et al.* 1982; Martin *et al.* 2008; Giugliani *et al.* 2010). Deformidades dentárias, bem como hipertrofia e hiperplasia de gengivas, também são relatadas nesses pacientes. As manifestações cardiológicas são frequentes e costumam ser observadas ao redor dos 5 anos de idade, sendo geralmente a principal causa de óbito (Martin *et al.* 2008). As manifestações oculares incluem papiledema, atrofia de nervo óptico e distrofia da retina (Schumacher *et al.* 2007; Martin *et al.* 2008, Anawis 2006). Os pacientes com MPS II apresentam também alterações dermatológicas, como hirsutismo (Wraith *et al.* 2008), mancha mongólica e lesões papulares causadas por depósito de GAGs, consideradas típicas, embora não exclusivas, de MPS II (Ochiai *et al.* 2003; Sanjurjo-Crespo 2007; Martin *et al.* 2008). As manchas mongólicas extensas podem levar ao diagnóstico precoce em pacientes com formas leves (Martin *et al.* 2008).

1.3.3A ENZIMA IDURONATO 2-SULFATASE

1.3.3.1 CARACTERIZAÇÃO DA ENZIMA IDURONATO 2-SULFATASE HUMANA

A enzima iduronato 2-sulfatase humana ou alfa-L-iduronato sulfato sulfatase ou idursulfase humana (I2Sh ou IDSh) (Bach *et al.* 1973) é uma hidrolase lisossomal responsável pelo início do processo catalítico fisiológico de degradação do heparan sulfato e dermatan sulfato. Evita o acúmulo desses GAGs em todos os órgãos e cérebro, embora não atravesse a barreira hemato-encefálica (Lu *et al.* 2010). Tem sido descritas três isoformas diferentes (Anexo 3) produzidas por *splicing* alternativo pré-mRNA: isoformas 1, 2 e 3 que possuem 550, 343 e 312 resíduos de amino-ácidos, respectivamente (<http://www.uniprot.org/uniprot/P22304>. *Last modified* July 24, 2013). A isoforma 1 ou longa (P22304-1) é escolhida como a sequência mais representativa e serve de base para os estudos e publicações. O arranjo linear

de aminoácidos (AA) dispostos na cadeia peptídica por ligação covalente caracteriza a estrutura primária da proteína. A isoforma 1 da enzima IDS, no formato FASTA, está representada na Figura 19. Wilson *et al.* (1990) isolaram e sequenciaram um clone de cDNA do gene IDS, de aproximadamente 2,3 kb, que codifica para a sequência completa da enzima IDS humana. A análise dos dedutíveis 550 aminoácidos (AA) da sequência da enzima precursora indica que a IDS possui um peptídeo sinalizador de 25 AA no terminal-N (posição 1 a 25), local de inserções pós-traducionais, destinado a interagir com a partícula de reconhecimento e dirigir o ribossoma para o retículo endoplasmático. Os precursores de 76 kDa e 90 kDa da enzima IDS, após vários processos pós-transcricionais como proteólise, glicosilação e fosforilação, são convertidos a várias formas intermediárias no caminho da transformação nas formas maduras de 55 kDa e 45 kDa. Os 8 aminoácidos na sequência do peptídeo sinal são removidos da proteína através de uma clivagem proteolítica interna. A leitura da sequência de resíduos de AA pode identificar sete sítios potenciais de glicosilação - essenciais para a formação da estrutura terciária da proteína - ligados a N ou asparagina (NXS / T motif) nas posições 115, 144, 246, 280, 325, 513 e 537 (Millat *et al.* 1997). Estudos de expressão mostraram que todos estes sítios de glicosilação podem ser utilizados e que nenhum deles, isoladamente, é essencial para a estabilidade da IDS, embora o sítio na posição 280 seja importante para o direcionamento do ribossoma. Os oligossacarídeos ligados a N desempenham um papel fundamental na função, dobragem e estabilidade das glicoproteínas (Hammond *et al.* 1994). Na posição 525 (v = valina), reside o sítio provável do início da tradução do éxon 9 (Millat *et al.* 1997).

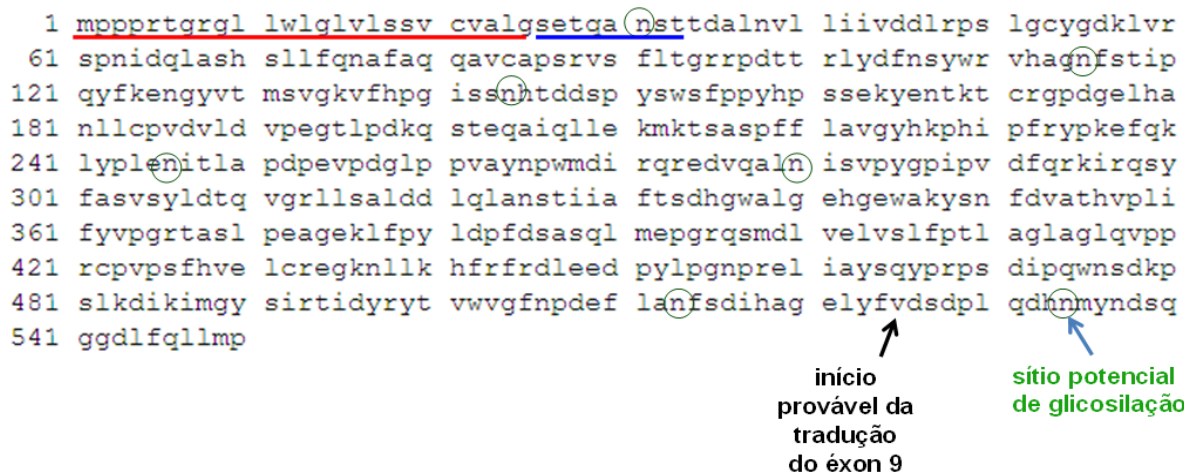


Figura 5. Estrutura primária da isoforma 1 da enzima IDS humana.

Fonte: <http://www.uniprot.org/uniprot/P22304>.

Os estudos estruturais desenvolvidos por Bond *et al.* (1997) e Lukatela *et al.* (1998) mostraram *motifs* conservados similares na N-acetylgalactosamina-4-sulfatase (arilsulfatase B), cerebroside sulfatase e outras sulfatases. A análise do alinhamento múltiplo de todas estas proteínas revelou conservação dos elementos da estrutura do *core* da fosfatase alcalina e de sulfatases, sugerindo que elas pertencem a uma superfamília distinta com uma *fold* estrutural comum - a superfamília da fosfatase alcalina. O *set* conservado de resíduos de aminoácidos presentes em todas essas enzimas é, provavelmente, necessário à atividade enzimática. Mutações na vizinhança destes resíduos em várias sulfatases são as causas das mucopolissacaridoses (Síndromes de Maroteaux-Lamy, Morquio, Sanfilippo e Hunter) (Bond *et al.* 1997; Lukatela *et al.* 1998; Galperin *et al.* 2008;). Muitas mutações nos genes que codificam as sulfatases causadoras de diferentes MPSs são do tipo *missense*. Algumas delas resultam da substituição de um único aminoácido nos *motifs* conservados e se tornam capazes de suprimir a atividade enzimática, conforme revisto por Henthorn *et al.* (1992) e Parenti *et al.* (1997). A sequência da IDS tem forte homologia com as sequências de outras sulfatases (como arilsulfatase do ouriço do mar, arilsulfatases humanas A, B, e C, e glucosamina 6-sulfatase humana), sugerindo que os genes codificadores das sulfatases compreendem uma família de genes relacionados evolutivamente, a partir da duplicação e evolução divergente. Além de elevado grau de identidade de sequência (20 a 60%), as sulfatases de mamíferos possuem sítios de ligação de cátions divalentes (centro ativo) e mecanismo catalítico comum - catalisam a hidrólise de ligações de ésteres sulfatados na extremidade não redutora dos GAGs. Apresentam alta especificidade para o substrato, de modo que a deficiência de cada

uma delas tem sido associada a um estado de doença específica (Parkinson-Lawrence *et al.* 2005).

A estrutura primária se dobra em configurações peculiares, formando estruturas secundárias e terciárias, de modo que cada enzima tem uma forma tridimensional específica. A estrutura terciária comum nas sulfatases está envolvida na definição da ordem dos resíduos catalíticos conservados que formam o sítio catalítico, o qual é gerado durante o processamento da proteína no retículo endoplasmático (von Schmidt *et al.* 1998).

Atualmente, existe um vasto número de programas de computador desenvolvidos para o estudo de biomoléculas, através dos quais é possível prever a estrutura e a função de grandes complexos moleculares. Com esses recursos, Saenz *et al.* (2007) criaram modelos de estrutura secundária, terciária e sítio ativo para a enzima IDS. O consenso das predições dos programas empregados, montando resíduo por resíduo de aminoácido, permitiu a construção de um modelo para a estrutura secundária da IDS_h (Figura 20).

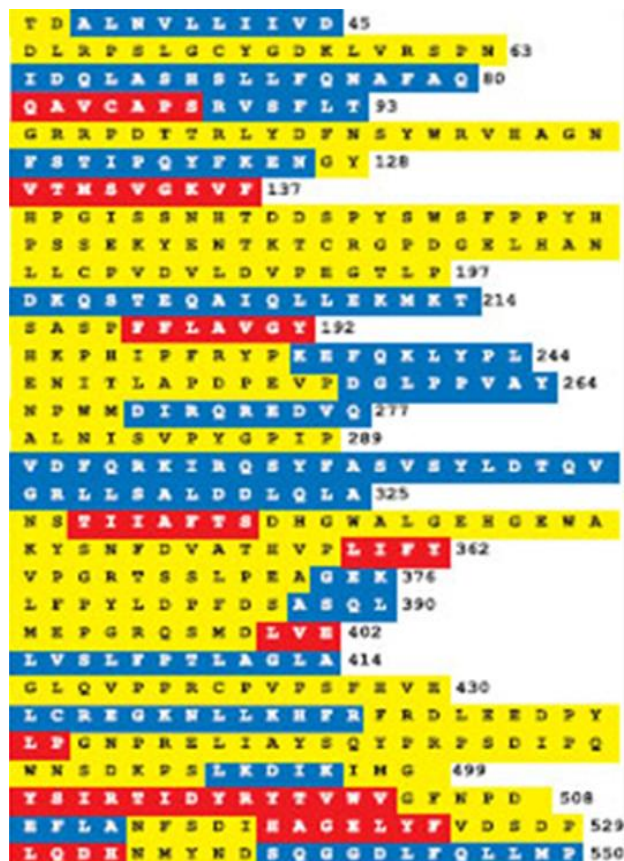


Figura 6. Predição da estrutura secundária da IDS humana (33% em hélice representada em azul; 13% em folha dobrada, em vermelho; 54% em ondulação aleatória, em amarelo).
 Fonte: Saenz *et al.* (2007)

A não cristalização da enzima iduronato 2-sulfatase inviabiliza o conhecimento de sua estrutura terciária através de métodos experimentais. Ao contrário, as estruturas cristalinas da N-acetilgalactosamina-4-sulfatase (arilsulfatase B) (Bond *et al.* 1997) foram definidas. Essas proteínas monoméricas são compostas por dois domínios: um domínio N-terminal de grandes dimensões que pertence à classe α/β de proteínas e contém o sítio ativo, e um domínio C-terminal menor. As semelhanças entre as enzimas da família das sulfatases de mamíferos têm sido usados para justificar a modelagem molecular das proteínas de outros membros da família, inclusive da enzima iduronato-2-sulfatase (IDS) (Kim *et al.* 2003).

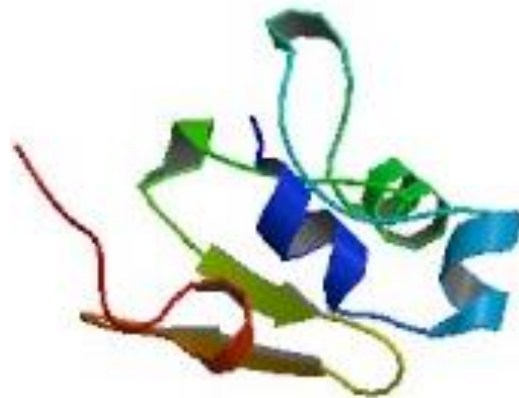
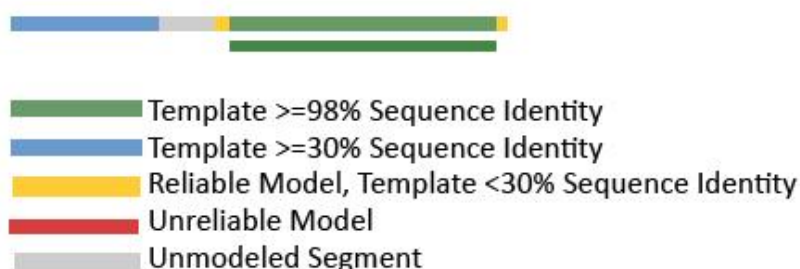


Figura 7. Modelo da estrutura terciária da proteína IDS humana (identidade de sequência de 37%).

Fonte: ModBase: Database of Comparative Protein Structure Models:
 (http://www.proteinmodelportal.org/?pid=modelDetail&pmpuid=1000015275333&range_from=1&range_to=550&ac=P22304&zid=async)



Modbase Model Sequence

Sequence ID:

c19fdd7045580b14e44e63042c099435MPPPLLMP

CRC64:EA1B713417280413

Model ID: 25218bce41d81c6c65d23cb40eb04d85

MPPPRTRGRLLWLGLVLSSVCVALGSETQANSTTDALNVLLIIVDDLRLPSLGCYGDKLV
 SPNIDQLASHLLFQNAFAQQAVCAPSRVSFLTGRRPDTTRLYDFNSYWRVHAGNFSTIP
 QYFKENGYVTMSVGKVFHPGISSNHTDDSPYSWSFPPYHPSSEKYENTKTCRGPDGELHA
 NLLCPVDVLDVPEGTLDPKQSTEQAIQLLEKMKTSASPFFLAVGYHKPHIPFRYPKEFQK
 LYPLENITLAPDPEVPDGLPPVAYNPWMDIRQREDVQALNISVPYGPPIVDFQRKIRQSY
 FASVSYLDTQVGRLLSALDDLQLANSTIIAFTSDHWALGEHGEWAKYSNFDVATHVPLI
 FYVPGRTASLPEAGEKLFYLDPFDSASQLMEPGRQSMDLVELVSLFPTLAGLAGLQVPP
 RCPVPSFHVELCREGKNLLKHFRFRDLEEDPYLPGNPRELIAYSQYPRPSDIPQWNSDKP
 SLKDIKIMGYSIRTIDYRYTVWVGFNPDEFLANFSDIHAGELYFVDSPLQDHNMYNDSQ
 GGDLFQLLMP

Dados do modelo: Enzima IDS (Iduronato-2-sulfatase) - S. de Hunter

Tamanho da proteína: 550 AA

Segmento modelado: 338-420 **Tamanho:** 83 AA

Identidade de sequência: 37%

1.3.3.2 VIAS METABÓLICAS

A hidrolase iduronato 2-sulfatase humana (I2Sh ou IDS) inicia a degradação de glicosaminoglicanos (Bach *et al* 1973). Exerce ação catalítica através da hidrólise dos grupos 2- sulfato das unidades L-iduronato 2-sulfato do dermatan sulfato e heparan sulfato, sem a qual não ocorrem as demais reações enzimáticas em cadeia.

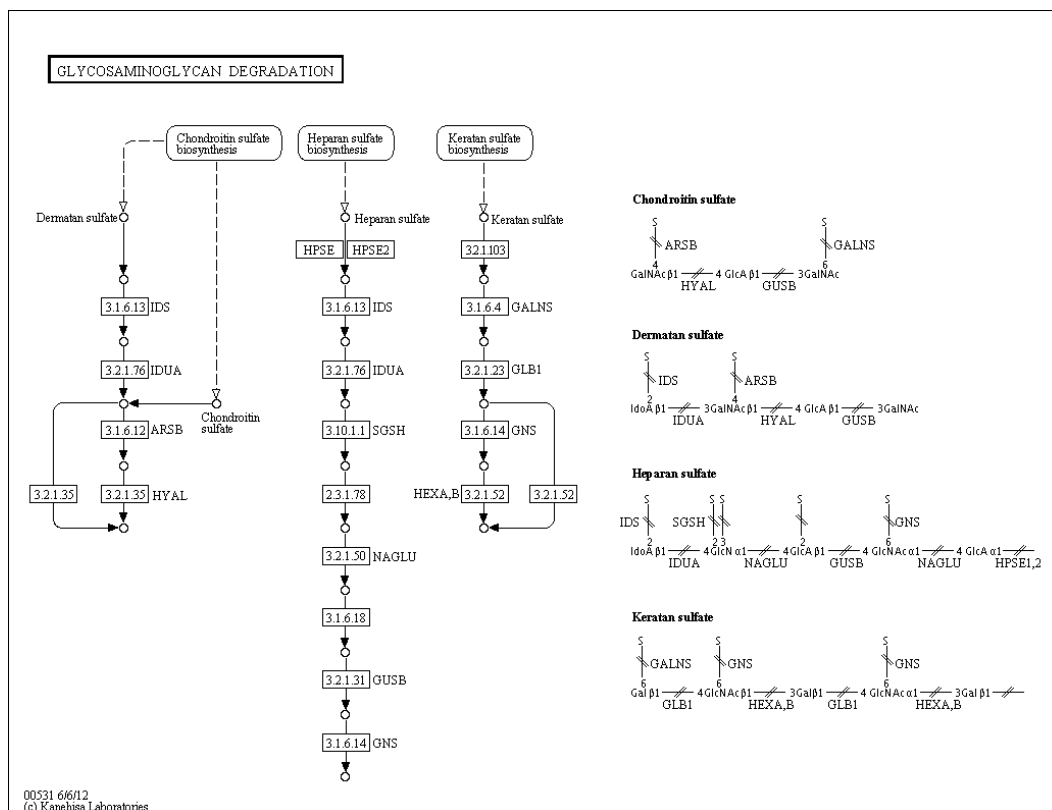


Figura 8. Vias metabólicas de degradação dos GAGs.

Fonte: (<http://www.genome.jp/kegg/pathway/map/map00531.html>).

As Figuras 9 e 10 (Neufeld e Muenzer 2001) repetem, com maiores detalhes, as vias de degradação do heparan sulfato e do dermatan sulfato, respectivamente.

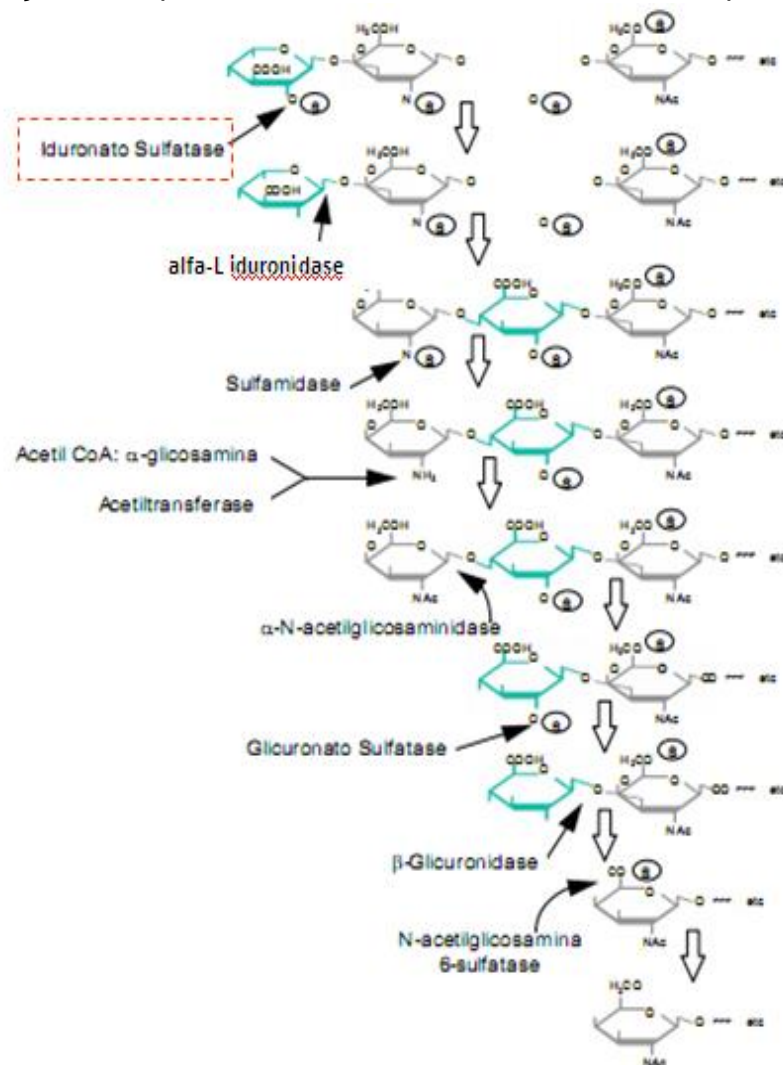


Figura 9. Via de degradação do heparan sulfato

Fonte: Adaptado de Winchester (1992); Neufeld e Muenzer (2001).

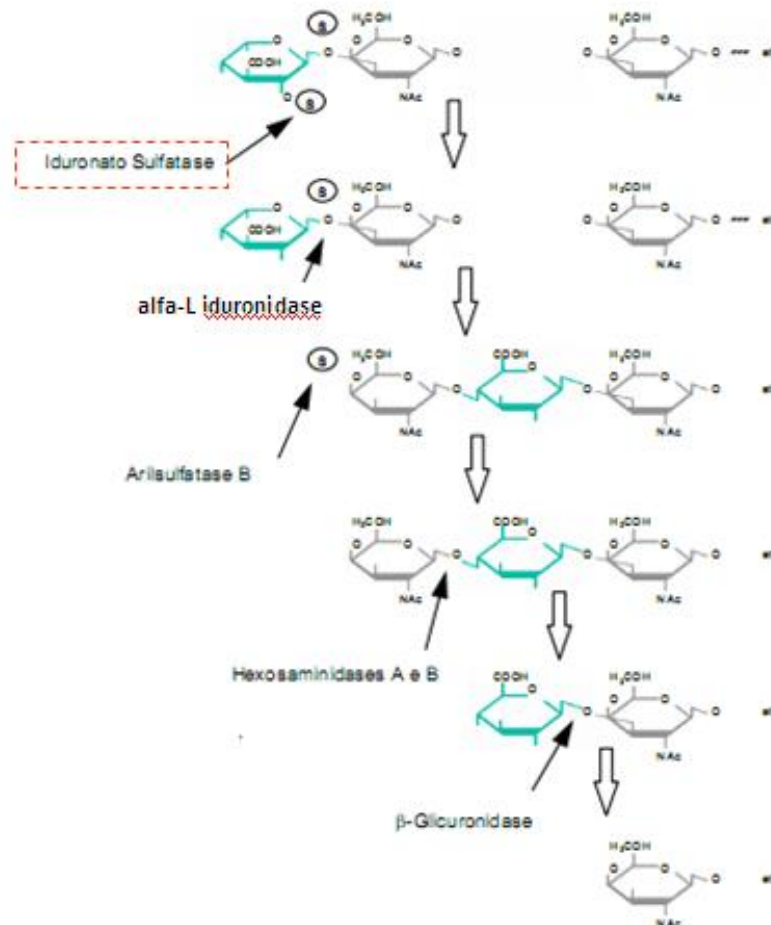


Figura 10. Via de degradação do dermatan sulfato.

Fonte: Adaptado de Winchester (1992); Neufeld e Muenzer (2001).

Os mecanismos fisiopatológicos, no entanto, não estão completamente esclarecidos. Considerando que a geração de radicais livres está envolvida na patogênese de várias doenças, inclusive em alguns erros inatos do metabolismo, estudo pioneiro conduzido por Felippon (2011) em pacientes Hunter brasileiros, procurou relacionar parâmetros de estresse oxidativo e danos ao DNA, antes e durante a terapia de reposição com idursulfase. Níveis plasmáticos de

malondialdeído (MDA) e de grupamentos carbonila, assim como da atividade da catalase eritrocitária (CAT) estavam aumentados em pacientes com MPS II antes do tratamento quando comparado com os controles. Ao contrário, o conteúdo de grupamentos sulfidril e o estado antioxidante total (TAS) plasmáticos estavam significativamente diminuídos, enquanto a atividade da superóxido dismutase (SOD) eritrocitária não estava alterada antes do início do tratamento quando comparado com os controles. Durante a TRE, houve uma redução significativa nos níveis de MDA e um aumento significativo de grupamentos sulfidril, quando comparados com o pré-tratamento. A análise do DNA em leucócitos periféricos antes e durante o tratamento, mostrou um aumento significativo no dano ao DNA quando comparado com os controles. A TRE diminuiu significativamente esse dano. Além disso, foi verificada uma correlação positiva, estatisticamente significativa, entre o dano ao DNA e os níveis de MDA, assim como com o conteúdo de grupamentos carbonila. O autor concluiu que pacientes com MPS II estão sujeitos a dano oxidativo ao DNA e que a TRE é capaz de protegê-lo contra esses danos.

A Iduronato-2-sulfatase é expressa em ilhotas pancreáticas (Flomen *et al.* 1993; Malmgren *et al.* 1995). Foi demonstrado o envolvimento dessa enzima na via normal de degradação lisossomal dos peptídeos secretores, sugerindo um papel na funcionalidade da célula β secretora de insulina. Em outro estudo conduzido por Piquer *et al.* (2009), comprovou-se que a IDS humana potencializa a resposta secretora de insulina estimulada pela glicose em comparação com controles sem alterações nos níveis de mRNA da insulina ou do conteúdo de peptídeo de insulina. O efeito da superexpressão da IDS na liberação de insulina se dá através de um mecanismo que envolve a ativação da exocitose.

1. 3.4 DIAGNÓSTICOCLÍNICO E LABORATORIAL

A raridade das MPSs e a desinformação sobre esse grupo de doenças por parte dos profissionais de saúde, à exceção dos geneticistas, explicam a demora do diagnóstico clínico (Whitley 1993; Wilcox 2004). De modo geral, o diagnóstico de MPS II poderia ser suspeitado em meninos entre os dezoito meses e os quatro anos de idade, com história de infecções frequentes no ouvido e seios nasais, que exibem contraturas articulares, macrocefalia e fácies grosseira, hepatoesplenomegalia e

hérnia umbilical. O exame radiológico do esqueleto pode mostrar anomalias esqueléticas múltiplas, conhecidas como disostose múltipla, as quais podem não estar presentes no início da vida e não são exclusivas de MPS II.

As dosagens enzimáticas em leucócitos e plasma são exames aceitos atualmente como o padrão-ouro para a confirmação diagnóstica definitiva. O novo método fluorimétrico de quantificação da atividade da enzima iduronato sulfatase em sangue heparinizado permite a obtenção do diagnóstico final ou específico destes pacientes (Voznyi *et al.* 2000). A dosagem da enzima IDS em sangue colhido em papel filtro e deixado secar, pela facilidade técnica de acondicionamento e transporte, pode ser usado de rotina como teste inicial. Ainda estão disponíveis nos laboratórios de referência, protocolos de identificação e quantificação de mucopolissacarídeos acumulados na urina. Empregam o teste de azul de toluidina, a cromatografia e métodos de dosagem.

A ausência ou a baixa atividade da enzima IDS em homens, no conceito atual, tem valor diagnóstico. No entanto, valores numéricos absolutos não podem ser usados para prever o grau de severidade do fenótipo.

O diagnóstico pré-natal da síndrome de Hunter emprega a dosagem da enzima iduronato-2-sulfatase no soro materno. Nas gestações de fetos normais, os níveis de IDS são persistentemente elevados e o aumento normal ocorre, usualmente, da 6^{a.} a 12^{a.} semana de gestação. Nas gestações de fetos masculinos com Hunter, os níveis séricos da enzima não se alteram. (Zlotogora e Bach 1986). O diagnóstico pré-natal pode utilizar a medida da atividade enzimática em células obtidas no líquido amniótico, em tecido do vilus coriônico (Keulemans *et al.* 2002; Cooper *et al.* 1991) a partir da 11^{a.} semana de gestação ou em cultivo de células do líquido amniótico a partir da 16^{a.} semana. Zhang *et al.* (2011) recomendam a detecção do sexo fetal (análise cromossômica) associada à dosagem enzimática de IDS em todas as gestações de risco quando a mutação não está identificada e o estudo molecular quando a mutação é conhecida. No entanto, estas técnicas ficam restritas a uns poucos laboratórios de centros de pesquisa.

1.3.5 GENÉTICA DA MPS II

1.3.5.1 OS CROMOSSOMOS SEXUAIS

O cromossomo X guarda peculiaridades únicas no genoma humano em consequência da evolução dos cromossomos sexuais em mamíferos, nos últimos 300 milhões de anos, a partir de um par de autossomos. Neste processo evolutivo, os elementos originais garantidores da funcionalidade do cromossomo X têm sido conservados. Por outro lado, o cromossomo Y perdeu quase todos os vestígios do autossomo ancestral, incluindo os genes que eram compartilhados com o cromossomo homólogo. Para a maioria dos *locus* do cromossomo X, verifica-se hemizigotia nos indivíduos do sexo masculino pela ausência do alelo no cromossomo homólogo. Este fenômeno expõe os homens a fenótipos recessivos. A MPS II é uma doença genética recessiva ligada ao cromossomo X, o que lhe confere excepcionalidade entre as demais MPSs, cujo modo de transmissão hereditária exemplifica a recessividade autonômica.

O sequenciamento do cromossomo X foi concluído em 99,3% através de trabalho multicêntrico publicado em 2005 (Bentley *et al.* 2005). A análise da sequência ilustrou a origem autossômica dos cromossomos sexuais dos mamíferos - o processo multietapas - que levou à perda progressiva da recombinação entre X e Y e a extensão da degradação subsequente do cromossomo Y. De um total de 1.098 genes sequenciados no X humano, apenas 54 têm alelos funcionais no cromossomo Y (Carrel e Willard 2005). Nas Figuras 11 e 12, a representação esquemática dos cromossomos X e Y humanos. Destaque para a localização citogenética do gene IDS (banda citogenética Xq27.3-q28), coordenadas genômicas: X:148,560,294 - 148,586,883.

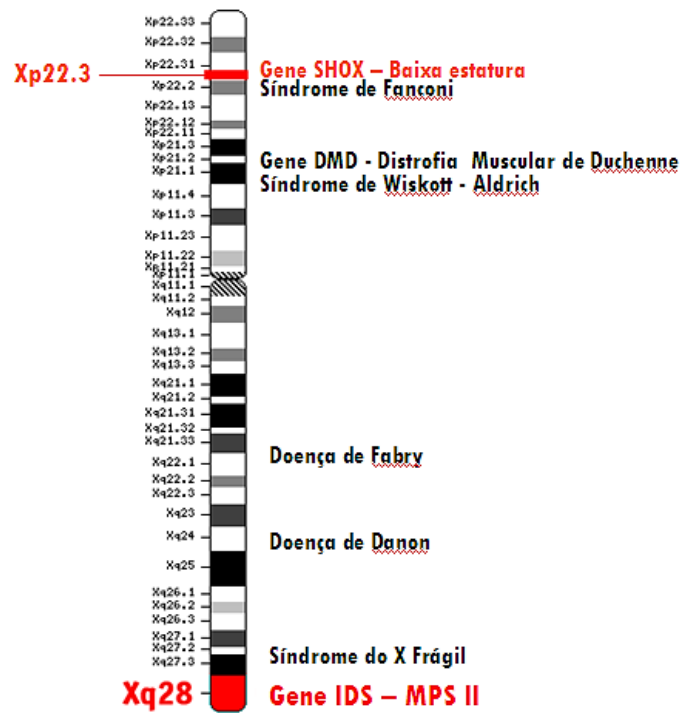


Figura 11. Representação esquemática do cromossomo X.

Fonte: Adaptado de *National Library of Medicine* e QIAGEN, SA Biosciences.

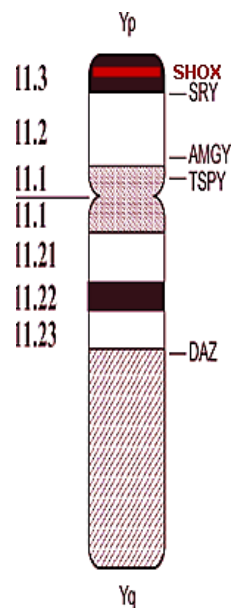


Figura 12. Representação esquemática do cromossomo Y.

Fonte: Adaptado de *National Library of Medicine* e QIAGEN, SA Biosciences.

Os éxons dos 1098 genes sequenciados no X somam apenas 1,7% da sequência do cromossomo. Com base no comprimento desses loci gênicos, estima-se que 33% do cromossomo sejam transcritos. Este valor é consideravelmente inferior às estimativas recentes de outros cromossomos e representa um reflexo não apenas da baixa densidade gênica (7.1 genes por Mb), mas também do baixo

comprimento dos genes. Por exemplo, a média de comprimento dos genes no cromossomo X é de 49 quilobases (kb), enquanto no cromossomo 13 é de 57 kb. Curioso é que este cromossomo sexual contém o maior gene conhecido do genoma humano, o gene DMD, situado no locus Xp21.1, que se estende por 2.220.223 bp (Carrel e Willard 2005; Bentley et al. 2005).

Entre as 168 doenças mendelianas documentadas para o cromossomo X e relacionadas às mutações em 113 genes, além da Síndrome de Hunter (mutação no gene IDS), merecem destaque: a distrofia muscular de Duchenne, decorrente de mutações no gene DMD que codifica a proteína distrofina, essencial para a manutenção da integridade da membrana da célula muscular; as síndromes de baixa estatura consequentes de mutações no gene SHOX ou *Stature HOmeoboX containing gene* (locus Xp 22.3), observadas em dois terços dos portadores da Síndrome de Turner, em 77% dos portadores de discondrostose de Leri-Weill, uma forma comum de displasia esquelética de herança autossômica dominante e em 3% das crianças com baixa estatura idiopática (Alexander et al. 2008); a Síndrome do X Frágil, expressão consagrada pelo achado de um estreitamento (“sítio frágil”) do extremo distal do cromossomo X ao tempo em que se empregava o estudo citogenético como método diagnóstico, devido a mutação no gene do locus Xq28 (Wilson et al. 1991). A Síndrome do X Frágil afeta principalmente os homens, os quais apresentam atraso mental e um fenótipo característico - face alargada com fronte ampla, queixo proeminente, orelhas grandes, hiperextensibilidade articular e macroorquidismo (Ribate-Molina et al. 2010).

O cromossomo Y não é essencial à vida do indivíduo. Comparado a outros cromossomos, carrega poucos genes, sendo mais de 50% da sua sequência composta de elementos repetidos (longas sequências de DNA que formam palíndromos), mas desempenha um papel central na biologia humana – a determinação do sexo gonadal através do gene SRY. Este gene garante o fenótipo masculino a partir da transformação das gônadas embrionárias em testículos e não em ovários. Outros genes estão relacionados ao desenvolvimento e manutenção de células germinativas (Quintana-Murci e Fellous 2001). Durante a meiose, o processo de recombinação entre os genes dos cromossomos X e Y fica restrito àqueles localizados em regiões curtas nas extremidades dos braços do cromossomo X masculino que encontram alelos distribuídos ao longo de dois segmentos subteloméricos equivalentes no Y, as chamadas regiões pseudoautossômicas. Os genes dentro dessas regiões são compartilhados entre os cromossomos sexuais,

comportamento descrito como "pseudoautossômico". Genes fora dessas regiões são estritamente ligados ao X e a grande maioria está presente em uma única cópia no genoma masculino. Os genes de uma terceira porção Y-específica (mais de 90% do cromossomo) não sofrem recombinação. Deste modo, ao contrário de outros cromossomos, muitos genes do Y (haplótipos) escapam da recombinação meiótica e geralmente, passam intactos de geração à geração até que ocorra uma mutação (Pena *et al.* 1997).

1.3.5.2 CARACTERIZAÇÃO DO GENE IDURONATO-2-SULFATASE HUMANO

O gene Iduronato-2- sulfatase humano está localizado no telômero do braço longo (q) do cromossomo X, na posição Xq27.3-q28 (Figura 8), mais precisamente, a partir dos pares de bases 148, 560, 294 para os pares de bases 148, 586, 883, e não possui o alelo no Y. Sua sequência está disponível no GenBank, (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=IDS>). Como resultado de *splicing* alternativo, três variantes (mRNA) do gene (Anexo 2) são transcritos - variantes 1 (5876 bp), 2 (1437 bp) e 3 (5832 pb), que codificam, respectivamente, para as três isoformas A, B e C da enzima IDS (Li *et al.* 2012; http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM_000202.5. Dados atualizados em 17 de abril de 2013). Wilson *et al.* (1990) isolaram e sequenciaram um clone de cDNA de 2,3 kb que codifica para a sequência completa da enzima IDS humana (um polipeptídeo de 550 aminoácidos, incluindo um peptídeo sinal de 25 aminoácidos). O cDNA do gene IDS foi detectado de espécies de RNA de 5,7- 5,4 - 2,1 e 1,4 kb, em RNAs de placentas humanas e revelou alterações estruturais e deleções grosseiras em muitos dos pacientes estudados com síndrome de Hunter clinicamente graves. Três anos mais tarde, os mesmos autores isolaram três clones genômicos sobrepostos, derivados de uma biblioteca específica de cromossoma X contendo o gene IDS inteiro e determinaram as sequências do íntron limite e da região 5' do promotor. O promotor potencial não possui uma TATA *box*, mas contém sequências GC *box* de consenso, consistente com o seu papel de um *housekeeping gene*. O gene IDS é dividido em nove éxons, abrangendo aproximadamente 24 kb (Wilson *et al.* 1993). Bondeson *et al.* (1995) identificaram um segundo gene IDS (designado IDS2), localizado dentro de 90 kb de distância do gene IDS funcional, na direção telomérica. Contém sequências que são cópias dos éxons 2 e 3, embora em ordem

reversa e dos íntrons 2, 3 e 7 do gene IDS funcional (Scarpa 2011). Para Tajima *et al.* (2013), a sequência é 100% idêntica no éxon 3 e 96% nos demais segmentos.

1.3.5.3 MUTAÇÕES DESCRITAS NO GENE IDURONATO-2-SULFATASE E CORRELAÇÃO GENÓTIPO - FENÓTIPO

Mutações não silenciosas no gene IDS são as únicas alterações conhecidas que levam à MPS II. A expressão do gene fica comprometida e, na dependência do tipo e extensão da mutação, a atividade enzimática lisossomal IDS poderá ser mínima ou ausente. O acúmulo de heparan e dermatan sulfato nos lisossomas interrompe a função celular e causa as manifestações da síndrome.

Expressões gênicas diferentes podem definir graus variados de deficiência enzimática e quadros clínicos de maior ou menor gravidade. Nas palavras de Bunge *et al.* (1992), a ampla variabilidade clínica pode ser devida à extensa heterogeneidade molecular.

Até o ano de 2009, cerca de 376 mutações diferentes foram descritas no gene IDS (Quadro 3), a maioria composta de mutações pontuais (195/376) e pequenas deleções (68/376) (Lualdi *et al.* 2010; Filocamo *et al.* 2011).

Tipo de mutação	Número de casos
<i>Missense/nonsense</i>	195
<i>Splicing</i>	38
<i>Small deletions (<21 bp)</i>	68
<i>Small insertions (<21 bp)</i>	27
<i>Small indels</i>	7
<i>Gross deletions (>20 bp)</i>	29
<i>Gross insertions (>20bp)</i>	1
<i>Gross rearrangements</i>	11
Total	376

Quadro 3: Perfil mutacional no gene IDS

Fonte: Lualdi *et al.* 2010; Filocamo *et al.* 2011.
Em termos percentuais, o perfil mutacional assim se distribui: 51,8% de mutações pontuais transacionais (*missense/nonsense*); 27,1% somam pequenas inserções, deleções e “indels” (inserção+deleção); 11% são grandes deleções, inserções grosseiras e rearranjos complexos; 10,1% de alterações tipo *splice-site*. Muitas vezes, a expressão mutação pontual permite incluir inserções ou deleções de um único par de bases.

Dada à raridade da MPS II, a maioria das mutações apresentadas pelos pacientes corresponde a mutações privadas ou quase exclusivas de uma determinada população ou de um grupo familiar. Froissart *et al.* (1998) estudaram 70 indivíduos portadores de Hunter. Em 56 deles, 43 mutações diferentes foram identificadas e 31 delas ainda não haviam sido descritas. Rearranjos amplos foram identificados nos 14 pacientes restantes. Rathmann *et al.* (1996) identificaram mutações no gene IDS em um total de 31 famílias de pacientes com MPS II, dos quais 20 são novas e únicas e outra é também nova, mas foi encontrada em três pacientes não aparentados.

O gene IDS foi analisado em 20 pacientes tailandeses por Keeratichamroen *et al.* (2008), pertencentes a 18 famílias não aparentadas. Um total de 19 mutações diferentes, incluindo 9 mutações missense, 3 mutações nonsense, 3 alterações do sítio de *splicing*, 1 deleção, 2 *indels*, e 1 rearranjo foram identificadas, dos quais 8 foram novas mutações. Os autores concluíram que a MPS II na Tailândia é causada por um conjunto diversificado de defeitos que afetam tanto a produção da proteína IDS quanto a sua atividade biológica.

Guo *et al.* (2009), utilizando material obtido de manchas de sangue seco, realizaram o sequenciamento do DNA para analisar as mutações nos éxons 9, 3, 8 do gene iduronato-2-sulfatase (IDS) em um paciente chinês e sua genitora. Em ambos, foi encontrada uma mutação *missense* no éxon 8, com substituição da leucina pela prolina. A mudança na estrutura primária e terciária da proteína IDS comprometeu, severamente, a atividade enzimática no paciente.

Estudos sugerem que certas mutações que envolvem transições C para T ou G para A em dinucleotídeos CpG são causadas por processos de metilação-deaminação *in situ*. Essas regiões são consideradas como “*hot spots*” ou “*pontos-chaves*” para a ocorrência de mutações. No gene IDS, os dinucleotídeos CpG estão envolvidos em 47% das mutações originais e em praticamente todas as recorrentes. Ocorrem, mais frequentemente, nos éxons 3, 8 e 9 (Hopwood *et al.* 1993; Rathmann *et al.* 1996; Lin *et al.* 2006).

As mutações pontuais transacionais que ocorrem dentro da região codificadora - troca de uma única base (*missense* ou de sentido contrário) e *stop codon* prematuro (*nonsense* ou sem sentido) - podem codificar um aminoácido diferente e uma proteína não-funcional ou interromper a tradução. Para as mutações *missense*, a redução variável da expressão da atividade da enzima IDS predispõe a uma ampla multiplicidade de fenótipos e traduz graus variados de

severidade da doença, de modo que as previsões genótipo-fenótipo não são confiáveis (Li *et al.* 1999; Vafiadaki *et al.* 1998; Gort e Coll 1998; Moreira da Silva *et al.* 2001).

Na mutação R468W, a transição C para T corresponde a uma troca de um resíduo de arginina por um de triptofano na posição 468 do polipeptídeo precursor da enzima IDS. O impacto dessa mutação na estrutura protéica vai promover diminuição da atividade enzimática (Rathmann *et al.*, 1996; Tomatsu *et al.*, 2004).

Na série estudada por Froissart *et al.* (1998), dos 8 pacientes com fenótipo atenuado, 7 carregavam uma mutação do tipo *missense*, incluindo a R468W. Jonsson *et al.* (1995), também descreveram 3 pacientes com essa mutação, todos apresentando um fenótipo leve. Ao contrário, Lin *et al.* (2006) e Froissart *et al.* (2007) relataram fenótipos graves associados a essa mesma mutação. Nesses casos, uma mesma mutação pontual define diferentes fenótipos clínicos, pressupondo perda da atividade enzimática em graus variáveis. Fatores adicionais devem ser considerados como a presença de mutações em outros éxons e interferência de fenômenos epigenéticos.

Pequenas deleções e mutações em sítios de junção também podem estar associadas a fenótipos clínicos diversos, desde a forma atenuada até a grave.

As regiões homólogas do pseudogene IDS2 e do gene IDS normal e a pequena distância entre eles favorece eventos de recombinação que conduzem a rearranjos grosseiros e, por vezes, a grandes deleções de certos éxons ou do gene IDS inteiro (Bondenson *et al.* 1995; Scarpa 2011), definindo fenótipo severo. Tajima *et al.* (2013) publicaram o caso clínico de dois irmãos com MPS II, causada por uma mutação tipo recombinação IDS /IDS-2. No gene recombinante, os éxons 1, 4, 5, 6, 7 foram translocados para o locus IDS-2, alterando, de modo grosseiro, a estrutura do gene IDS e levando à forma grave da doença. A Figura 10 representa o gene IDS e o gene IDS-2 em processo de recombinação.

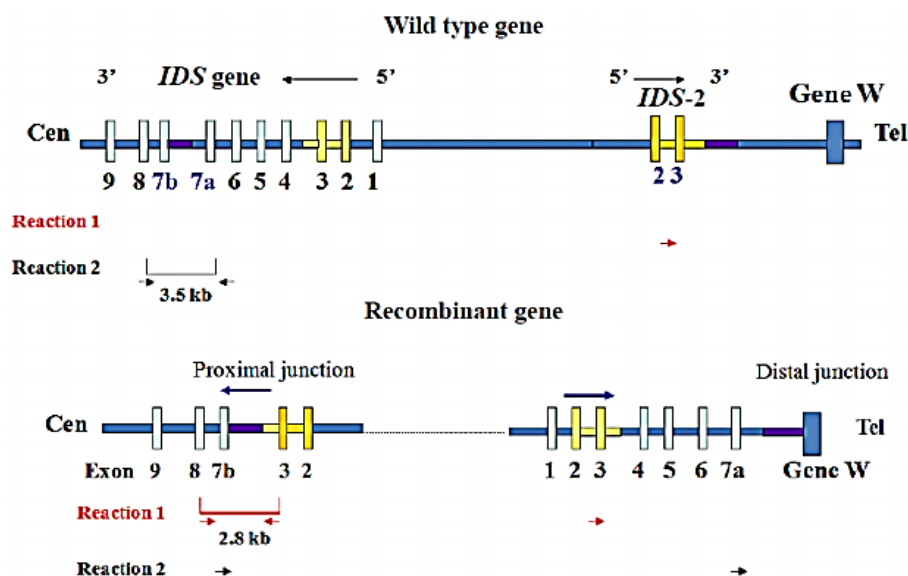


Figura 13. Recombinação do IDS e IDS2.

Fonte: Tajima *et al.* (2013)

A presença de vários transcritos em humanos normais reflete um mecanismo bastante complexo de *splicing* e sugere, fortemente, que o gene IDS é susceptível à mutações do tipo *splicing*, mutações que alteram o processamento do RNA, não favorecendo a retirada apropriada de regiões correspondentes aos íntrons. Esta suscetibilidade é particularmente elevada no éxon 3 e regiões vizinhas. Em consequência, o rastreamento das mutações do gene IDS não pode ficar restrito ao DNA genômico. A análise do cDNA também deve ser realizada. No entanto, existe pouca informação disponível sobre o papel das variações no locus IDS no processo de *splicing*. Segundo Alves *et al.* (2006), as mutações de *splicing* no locus IDS são importante fonte de MPS II, acometendo quase 56% dos casos descritos em portugueses.

Hopwood *et al.* (1993) revisaram as mutações envolvendo o gene IDS em confronto com as dosagens enzimáticas. Dos 319 pacientes estudados, em um total de 32 pacientes, foram caracterizadas 29 pequenas mutações. Estas definiram uma deficiência parcial da enzima com quadros clínicos mais leves. Outros 14 tinham deleção completa do gene e 48 apresentavam deleção parcial ou outro rearranjo. Todos os pacientes com deleção completa ou rearranjo grosseiro tinham manifestações clínicas severas decorrentes da deficiência total da enzima.

Meninos com ausência completa da enzima funcional como resultado de mutações *nonsense* (Hopwood 1993; Froissart *et al.* 2007), deleções completas do gene e grandes rearranjos, aproximadamente 17% dos indivíduos afetados (Hopwood 1993; Lin *et al.* 2006), invariavelmente, manifestam a grave apresentação neurológica da doença (Froissart *et al.* 2002; Wraith *et al.* 2008). As grandes deleções que se estendem além do locus do gene IDS, estimadas em 8% do total, podem incluir outros genes e resultar em síndromes complexas (Hopwood *et al.* 1993). Além de um severo comprometimento do SNC, devido à perda de genes adicionais podem estar associadas manifestações clínicas atípicas, como a ptose palpebral, síndrome da apnéia obstrutiva do sono e convulsões (Probst *et al.* 2007).

Bondeson *et al.* (1995) investigaram a ocorrência de rearranjos e deleções no gen IDS em 46 portadores de MPS II de diferentes etnias. Os pacientes com deleção completa do locus exibiam ptose palpebral e apneia do sono. Um menino de 2 anos de idade, apresentou um quadro de deficiência mental inesperadamente agravado, justificando uma avaliação mais aprofundada. O teste empregando *microarray* do cromossomo revelou uma grande deleção que incluiu os genes IDS, FMR1 e AFF2 (FMR2), confirmando o diagnóstico de Hunter e Síndrome do X Frágil (Burruss *et al.* 2012). Em 6 pacientes com a síndrome, Flomen *et al.* (1992) identificaram mutações no gene IDS, incluindo uma deleção completa, uma mutação *nonsense*, uma mutação pontual que criou um novo sítio de *splicing* e 3 mutações *missense*. Quatro das seis alterações de uma única base observadas neste estudo foram exemplos de transições do dinucleótido altamente mutável CpG para TpG.

O espectro de mutações encontradas no gene IDS de pacientes brasileiros portadores de MPS II pode ser analisado em dois estudos de referência. Macedo *et al.* (2008) publicaram o padrão mutacional de 93 pacientes cadastrados na Rede MPS Brasil até julho de 2008 e de 39 genitoras de pacientes. Foram identificadas mutações em 39 (42%) dos pacientes, assim distribuídas: 15/39 (38,5%) no éxon 9; 10/39 (25,6%) de inversões; 8/39 (20,5%) no éxon 7 e 6/39 (15,4%) no éxon 8 (Figura 11). Entre as mutações pontuais identificadas (n=10), 7 eram deleções, 3 inserções, 9 do tipo *missense*, 1 tipo *nonsense* e 1 ocorria em sítio de recomposição gênica. Entre as genitoras, o achado de heterozigotas foi confirmado em 16/39 (41%). Os autores confirmaram a grande heterogeneidade genética da MPS II e o destaque do éxon 9 como sede de mutações (Figura 11).

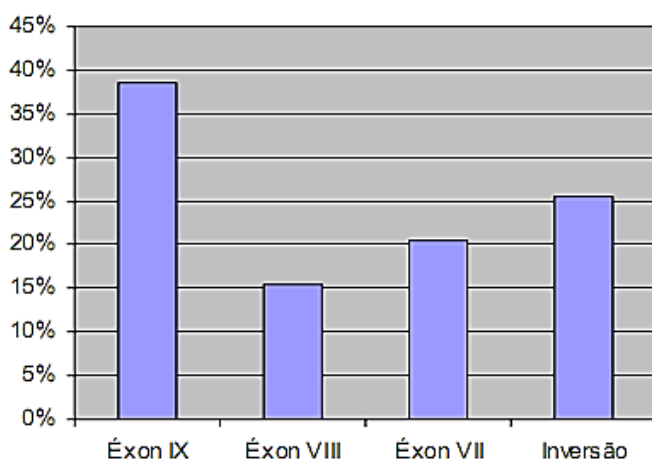


Figura 14. Localização das mutações encontradas em pacientes brasileiros com MPS II n=39/93.

Fonte: Macedo *et al.*(2008)

Em outro estudo brasileiro conduzido por Zimmer da Silva *et al.* (2011), 84 pacientes foram submetidos à análise molecular do gene IDS. Cerca de 51,5% do total de mutações foram identificadas. O éxon 9 foi o mais afetado, representando 26% do total, seguido do éxon 8 com 12% e éxon 7 com 9%. Dentre os demais éxons (1,2,3,4,5 e 6), o mais comprometido foi o 3 com 13% do total de mutações. Cerca de 9,5% dos pacientes apresentavam deleção total ou parcial do gene.

Em trabalho recente, Zhang *et al.* (2011), publicaram estudo genético envolvendo 38 chineses Hunter, entre os quais se incluía uma menina. Em 37 deles, foram identificadas mutações do gene IDS consideradas causadoras da Síndrome de Hunter, uma vez que não foram encontradas em 100 alelos de pessoas normais. Em outro paciente, nenhuma mutação foi achada após sequenciamento de todos os éxons codificadores e não se constatou recombinação entre o gene e o pseudogene IDS. Em apenas um paciente masculino, uma segunda mutação foi identificada. Foram descritas 30 mutações diferentes (aí incluídas 9 mutações novas) dentro das seguintes categorias: mutações pontuais exônicas, pequenas deleções, mutações intrônicas, pequenas inserções, deleções grosseiras e recombinações. Todos os éxons foram contemplados: éxon 9 (21%; 8/38), éxon 2 (11%; 4/38) e éxon 3 (11%; 4/38). Mutações pontuais exônicas predominaram perfazendo 58% (22/38) de todos os alelos. Outro grupo de mutações, 29% do total (11/38), envolveu deleções grosseiras e recombinação gene/pseudogene.

1.3.5.4 MUCOPOLISSACARIDOSE TIPO II EM MULHERES

Embora a MPS II seja ligada ao X, estando relacionada aos homens, tem sido bem documentada em um pequeno número de mulheres com quadro clínico similar ao dos meninos. De acordo com os dados publicados na literatura (Tuschl *et al.* 2005), o atraso do desenvolvimento neuro-psico-motor foi descrito na maioria das pacientes, caracterizando o fenótipo grave. Outras alterações são anotadas: face típica, surdez, hepatoesplenomegalia, disostose múltipla e contraturas articulares. O mecanismo mais comum responsável pela doença em mulheres heterozigotas é a inativação cruzada do alelo não mutante do cromossomo X paterno, resultando na transcrição do alelo materno portador da mutação. A hipótese levantada por Lyon (1961) de que a gravidade do fenótipo dependeria da mutação individual e do grau

deinativação por distorção do cromossomo X (Lyon 1961) foi defendida por outros autores (Cudry *et al.* 2000; Neufeld e Muenzer, 2001; Tuschl *et al.* 2005). Em fêmeas de mamíferos, muitos genes de um cromossomo X são aleatoriamente silenciados como um resultado do fenômeno da inativação do cromossomo X. No entanto, alguns genes do X ativo ou do inativo escapam da inativação e são expressos. Esses genes são reativados na linha germinal feminina e sofrem recombinação meiótica com os alelos do outro cromossomo X. Assim, as fêmeas têm apenas um cromossomo X ativo em cada célula somática, ou seja, apenas uma cópia de cada gene ligado ao X em funcionamento, à semelhança dos machos. Em humanos, mais de 15% dos genes ligados ao X escapa da inativação em algum grau, a maioria localizada nas regiões pseudoautosômicas de cada braço do cromossomo X (Freije *et al.* 1992; Bentley *et al.* 2005). Um adicional de 10% de genes mostra padrões variáveis de inativação e elevado grau de heterogeneidade de expressão entre as mulheres. Tais genes são contribuintes potenciais para traços sexualmente dimórficos, para a notável variabilidade fenotípica entre as mulheres heterozigotas nas condições ligadas ao X e para alterações clínicas em pacientes com cromossomos X anormais (Carrel *et al.* 2005). A doença de Hunter foi diagnosticada por Tuschl *et al.* (2005) em uma menina de 4 anos de idade, através da demonstração de baixa atividade de iduronato-2-sulfatase tanto em leucócitos quanto em fibroblastos e a presença de um novo rearranjo complexo do gene iduronato-2-sulfatase na forma heterozigótica. Concluíram que o fenótipo da doença, neste caso, é devido à completa inativação unilateral do cromossomo X paterno não mutante da paciente. Ressaltam o fato de que o diagnóstico de MPS tipo II deve ser suspeitado em qualquer mulher que se apresenta com sintomas clínicos relevantes. As mutações não foram identificadas nos dois primeiros casos publicados por Neufeld *et al.* em 1977. Clarke *et al.* (1991) defenderam que um dos casos poderia ser decorrente da deficiência múltipla de sulfatases. O mecanismo da deficiência intensa da enzima iduronato sulfatase (IDS) em pacientes do sexo feminino foi estudado nos casos descritos por Clarke *et al.* (1991), Sukegawa *et al.* (1997), Cudry *et al.* (2000), Sonh *et al.* (2010) e Zhang *et al.* (2011). Os autores postularam que a MPS II em mulheres resulta de uma mutação nova no gene IDS do cromossomo X materno associada à inativação cruzada do cromossomo X paterno.

O caso mais recente de Hunter no sexo feminino foi apresentado no 12º. International Symposium on MPS and Related Diseases. 2012 (Piña-Aguillar *et al.* 2012) - uma menina natural do México que exibia quadro clínico completo de MPS

II e baixa atividade da enzima IDS medida em amostras de sangue periférico. O sequenciamento do gene IDS identificou uma heterozigose de transição c.1327C →T no éxon 9. Esta mutação transacional mudou o códon 443 para um *stop codon* (TGA; p.Arg443). Aos 71 meses de idade (Figura 12), foi iniciada terapia de reposição enzimática (Elaprase), com melhora da rigidez articular e redução da organomegalia. No entanto, a paciente faleceu 7 meses depois devido a complicações respiratórias. Os autores concluíram que este é um dos casos raros de mulheres afetadas por MPS II devido ao efeito combinado de uma inativação distorcida do cromossomo X e uma nova mutação no gene IDS. Recomendaram que o diagnóstico de MPS II deve ser considerado, mesmo em uma menina sem histórico da doença na família.



Figura 15. Fenótipo da paciente com 71 meses de idade.

Fonte:Pinna-Aguilar *et al.* 2013

1.3.5.5 EM BUSCA DAS MULHERES HETEROZIGOTAS

As mulheres heterozigotas para as doenças ligadas ao cromossomo X são, em sua grande maioria, clinicamente assintomáticas. Deste modo, aquelas que carregam uma mutação em um alelo do gene IDS têm fenótipo normal (Clarke *et al.* 1993). Embora a atividade da enzima IDS em heterozigotas seja, teoricamente, a

metade da média da atividade encontrada em indivíduos normais e, na prática, revele-se menor quando comparada aos padrões normais, este critério não se mostra efetivo para identificar as portadoras da mutação IDS (Schwartz 2004; Schwartz *et al.* 2009; Camargo Pinto 2009; Camargo Pinto *et al.* 2011). Lin *et al.* (2006) confirmaram esses achados e identificaram uma pequena sobreposição de resultados em normais e portadoras.

O heredograma e foto de uma família sul-americana que abriga portadores de Síndrome de Hunter são mostrados na Figura 13. Os homens doentes (casos índices) aparecem dentro de retângulos e suas genitoras dentro de círculos (Martin *et al.* 2007).

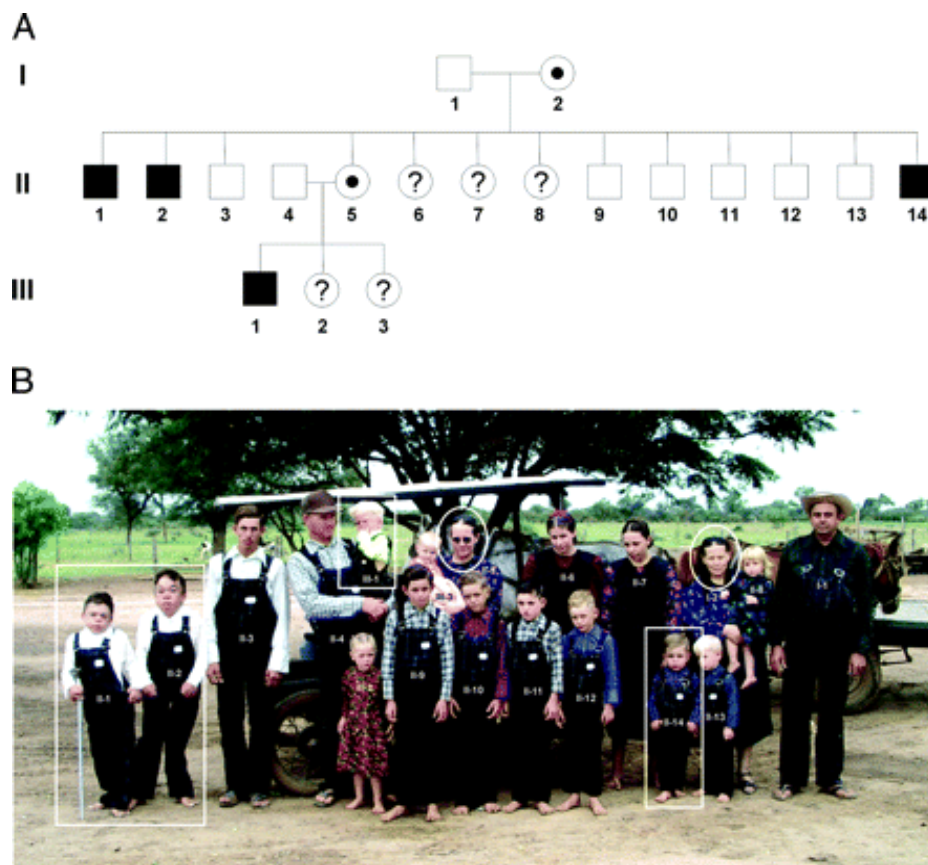


Figura 16. Heredograma e foto de uma família sulamericana com indivíduos portadores de Síndrome de Hunter.

Fonte: Martin *et al.* 2008.

A análise de um heredograma permite a identificação das mulheres portadoras da mutação quando são informados casos de meninos afetados em sua prole. Aquelas sem filhos permanecem sem identidade.

Um grupo de 52 mulheres com história familiar de MPS II foi estudado por Schwartz (2004), sob os seguintes aspectos: anamnese, exame físico, dosagens de GAGs urinárias e dosagens da enzima IDS no plasma e leucócitos. Nas 40 heterozigotas identificadas através de estudo molecular, todas assintomáticas, a excreção de GAGs urinários foi normal e a atividade IDS estava reduzida nas amostras de plasma e leucócitos.

Camargo Pinto (2009 e 2011) procurou identificar sinais e sintomas sutis e dados bioquímicos (exame físico, cariótipo, padrão de inativação X, atividade da enzima IDS em leucócitos e plasma, níveis de GAGs urinários, TC de abdômen e coluna e ressonância magnética cerebral) relacionados à MPS II em mulheres portadoras e, adicionalmente, estabelecer a associação desses achados com o padrão de inativação do cromossomo X. Foram avaliadas 40 mulheres pertencentes a 24 famílias brasileiras com história familiar para MPS II. A análise molecular do gene IDS identificou 22 heterozigotas e 18 não heterozigotas. Não foi encontrada qualquer evidência de manifestações clínicas sutis da MPS II em heterozigotas, nenhuma anormalidade no cariótipo e no TC de coluna vertebral. O padrão de inativação X não foi diferente entre os dois grupos. Embora estudos apontem para aumento da incidência de abortamentos em heterozigotas para doenças genéticas ligadas ao cromossomo X, nessas pacientes não houve aumento desta taxa. Houve diferença apenas na atividade IDS em plasma e em leucócitos, os quais foram menores nas heterozigotas. Os achados, concluiu a autora, sugerem que a MPS II apresenta uma baixa penetrância nas heterozigotas e 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.

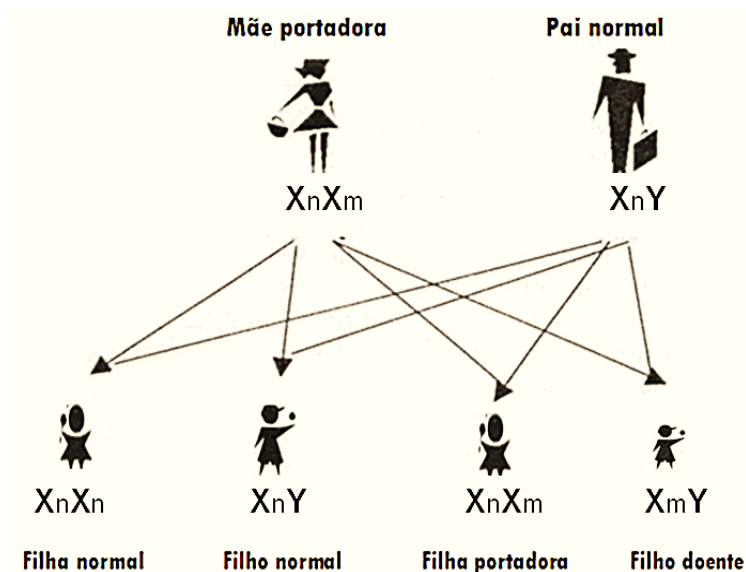
Lin *et al.* (2006), buscando caracterizar a deficiência bioquímica da enzima IDS em pacientes e seus familiares, mediram a atividade enzimática através de ensaio fluorimétrico em 14 pacientes de Taiwan com fenótipos variáveis. As medidas da IDS em leucócitos revelaram níveis elevados em controles normais e em portadoras assintomáticas (19.2 - 70.6 vs. 8.4 - 26.6 nmol/h/mg proteína). A atividade, em controles normais (n=43), foi 43.9±13.3 nmol/h/mg proteína, enquanto os pacientes com MPS II (n=14) tinham <5% da média normal (0.9±0.6 nmol/h/mg proteína) e os portadores (n=13) tinham uma atividade média de 17.5 (±/±

5.7) nmol/h/mg proteína. A média da atividade IDS em leucócitos em mulheres portadoras da mutação foi menor que a metade dos níveis normais. No entanto, a sobreposição de resultados em normais e portadoras desqualifica o nível de atividade enzimática para a identificação das mulheres portadoras.

1.3.5.6 ACONSELHAMENTO GENÉTICO

No processo de aconselhamento genético o indivíduo afetado (quando for possível e adequado) e os familiares são informados sobre a natureza, implicações da doença e modo de herança para ajudá-los a tomar decisões pessoais livres e esclarecidas e influenciar as decisões médicas. Os ganhos adicionais do aconselhamento envolvem a possibilidade do reconhecimento precoce da doença em outros membros da família, a instituição antecipada do tratamento e o planejamento familiar.

A situação mais comum na prática clínica envolve um casal fenotipicamente normal com um filho portador de MPS II (Figura 14). Neste caso, a mãe deve ser portadora da mutação do gene IDS (se outros casos da doença foram documentados na família) e a cada nova gestação existe risco de 50% de recorrência da doença para os meninos e de 50% de chances de meninas portadoras (Neufeld e Muenzer 2001).



n= alelo normal; m= alelo mutante

Figura 17. Herança recessiva ligada ao cromossomo X – S. de Hunter

Os riscos para os familiares de um paciente portador de MPS II (caso índice ou probando) podem ser avaliados como se segue:

1. Pais de um caso índice:

- O pai de um homem doente não terá a doença, nem será um portador da mutação;
- Em uma família com mais de um indivíduo doente, a mãe do doente pode ser uma portadora obrigatória;
- Se um homem tem mais de um filho doente e a mutação do IDS causadora da doença não pode ser detectada no DNA extraído de seus leucócitos, ela tem linha germinativa com mosaïcismo;
- Se a análise do heredograma revelar que o caso índice é o único membro afetado da família, a mãe pode ser uma portadora da mutação ou um homem afetado pode ter uma mutação nova. Neste caso, a mãe não é uma portadora.

Várias possibilidades a respeito do *status* de sua mãe precisam ser consideradas:

(1) O paciente tem uma mutação nova no IDS causadora da doença e sua mãe não é uma carregadora;

(2) Sua mãe tem uma mutação nova causadora de doença como uma "mutação germinativa" (isto é, presente no momento de sua concepção e, portanto, em cada célula do seu corpo), ou (b) como "mosaicismo germinativo" (isto é, presente apenas em algumas das suas células germinativas) (Froissart *et al.* 2007);

(3) Sua mãe tem uma mutação no gene IDS causadora da doença que herdou de sua genitora.

2. Irmãos do caso índice.

- O risco para os irmãos do probando depende do *status* de portadora da mãe.
- Se a mãe do probando tem a mutação do IDS causadora da doença a chance de transmissão em cada gravidez é de 50% para irmãos afetados e irmãs portadoras.
- Tem sido observado mosaicismo na linhagem germinativa (Froissart *et al.* 2007).

- Deste modo, mesmo se a mutação causadora da doença não tenha sido identificada no DNA dos leucócitos da mãe, os irmãos do probando ainda estão em maior risco de herdar a mutação causadora da doença.

3. Descendentes de um caso índice.

Homens afetados, em tese, podem transmitir a mutação a todas as suas filhas e a nenhum de seus filhos. Na hipótese de um homem doente que tenha capacidade de procriar, talvez como resultado do tratamento enzimático efetivo desde tenra idade, a prole com mulher normal traz 100% de chance de filhas portadoras e nenhum filho doente, enquanto a prole com mulher portadora (heterozigota) resulta em 50% de chances de filhas doentes (homozigota), 50% de filhas portadoras, 50% de filhos doentes e 50% de filhos normais. Na hipótese improvável, quase um exercício teórico, de homem doente e mulher doente (homozigota), toda a prole, meninas e meninos, seria doente.

4. Outros membros da família de um caso índice.

As tias maternas podem ser portadoras e filhos destas, dependendo do sexo, podem ser portadores ou doentes (Scarpa 2007).

Mas, qual das irmãs ou tias é normal? e qual é portadora?

Através da simples análise do heredograma, o *status* de portador da mutação para as mulheres sem filhos afetados é desconhecido, limitando o aconselhamento genético. A identificação precisa dos heterozigotos através de técnicas de biologia molecular é fundamental para o aconselhamento genético científico.

1.4 INFLUÊNCIA DE FATORES NUTRICIONAIS NA EXPRESSÃO GÊNICA

Todas as células em um organismo têm o mesmo DNA genômico. Identidades celulares distintas estrutural e funcionalmente ocorrem por causa de diferenças na expressão gênica, processo em que a informação codificada por um determinado gene é decodificada em uma proteína. Muitas dessas diferenças na expressão surgem durante o desenvolvimento e são mantidas através das mitoses sucessivas. Alterações estáveis desse tipo são denominadas mudanças epigenéticas, porque são hereditárias em curto prazo, embora não envolvam mutações no DNA (Jaenisch e Bird 2003). Na definição de Tang e Ho (2007), são mudanças herdáveis na expressão do gene que não alteram a sequência do DNA, mas que são mantidas, ao longo das gerações, pela mitose. A epigenética é a base da nutrigenômica, ciência que investiga os efeitos da alimentação sobre a estrutura

do cromossomo e a expressão de genes. Componentes da dieta, seletivamente, podem ativar ou inibir a expressão gênica.

Existem três mecanismos principais envolvidos na epigenética: padrão de metilação do DNA, alterações nas histonas (balanço entre a acetilação e a desacetilação) e atuação dos RNAs não codificadores que podem interferir na transcrição de genes (Tang e Ho 2007). Os padrões de metilação do DNA são suscetíveis ao excesso ou deficiência de compostos bioativos da dieta, como a metionina, o radical metil ($-CH_3$) e vitaminas, especialmente aquelas que atuam como cofatores das enzimas envolvidas no processo. Existe correlação entre a metilação do DNA e a atividade da cromatina. Quando o DNA estiver hipometilado, a cromatina estará ativa, permitindo a transcrição dos genes. A metilação progressiva diminui a atividade da cromatina e reduz a expressão gênica de tal modo que, quando o DNA estiver hipermetilado, a cromatina estará inativa e o gene silenciado (D' Alessio e Szyf 2006).

1.4.1 CICLO FISIOLÓGICO DA METIONINA - O PAPEL DA PIRIDOXINA E COBALAMINA NA METILAÇÃO DO DNA

Um dos processos bioquímicos fundamentais para a manutenção das reações de metilação é o ciclo da metionina- folato - trans-sulfuração (Figura 15). O amino-ácido essencial metionina (2-amino-3-metiltio-n-butírico), ativado pela enzima Metionina adenosiltransferase (MAT), dá origem a S- adenosilmetionina (SAM) (Lombardini e Talalay 1971). A SAM sofre desmetilação e se transforma em S-adenosilhomocisteína (SAH). No processo de desmetilação para SAH, a SAM atua como principal doadora de grupos metil para a biossíntese de diferentes substratos, como ácidos nucleicos, proteínas, fosfolipídeos e catecolaminas e o metabolismo de drogas e toxinas (Deminice *et al.* 2007; Finkelstein 2007; Lima Bueno 2009; Pedroza 2011; Werder 2010; Drew Ramsey e Muskin 2013).

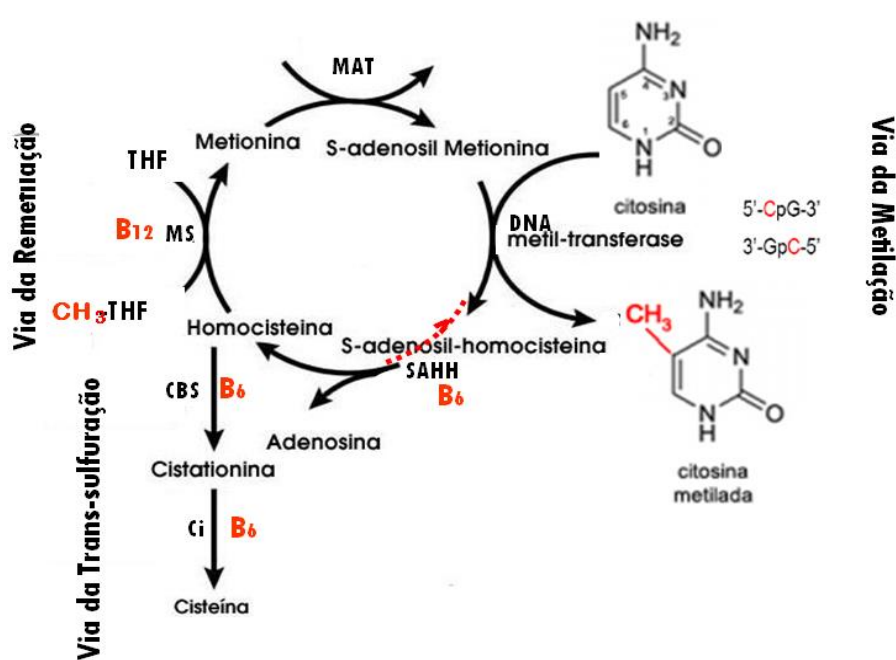


Figura 18. Representação esquemática do ciclo da metionina, ciclo do folato e via da trans-sulfuração.

Fonte: Adaptado de Finkelstein (2007), Werder (2010), Pedroza (2011).

Abreviaturas: Metil tetrahydrofolato (**CH₃-THF**); Tetrahydrofolato (**THF**); Metionina sintetase (**MS**); Metionina adenosil transferase (**MAT**); várias Metil transferases, incluindo as DNA metil transferases (**DNMTs**); S- Adenosil homocisteína (**SAH**); S- Adenosil homocisteína hidrolase (**SAHH**); Cistationina β sintetase (**CBS**); Cistationase (**Ci**); Vit B₆ (**Piridoxal**); Vit B₁₂ (**Cobalamina**). **DNMT1**: mantêm os padrões de metilação normais da célula **DNMT3a e DNMT3b**: promovem uma nova metilação no DNA, principalmente nas ilhas CpG.

A S-adenosilhomocisteína em mamíferos, em sua principal via catabólica, sofre hidrólise para adenosina e homocisteína (Hcy), reação reversível catalisada por uma hidrolase específica, a S-adenosilhomocisteína hidrolase (SAHH) (Lombardini e Talalay 1971, Werder 2010), na presença do piridoxol-5-fosfato (PLP), a forma metabolicamente ativa da piridoxina (vitamina B₆). A Hcy, um aminoácido sulfurado, pode ser metabolizada através de duas vias. Pela via da trans-sulfuração, parte da Hcy é catabolizada para cisteína e cistationina pelo concurso das enzimas Cistationina β sintetase (CBS) (Clayton 2006) e Cistationase (Ci), ambas igualmente dependentes da vitamina B₆ (Finkelstein 2007). Pela via da remetilação, outra fração da Hcy pode ser remetilada através de uma complexa reação que envolve a enzima Metionina sintase (MS) e a transferência de um grupo metil a partir de metiltetrahydrofolato, com o concurso da vitamina B₆ e da cobalamina (vitamina B₁₂), coenzimas essenciais nesta via metabólica. A vitamina B₁₂ também atua,

favorecendo a transformação do CH₃-THF (5-metil tetrahydrofolato) proveniente da dieta, em THF (tetrahydrofolato), o qual entra no ciclo do folato(Davis *et al.* 2005).

Os níveis plasmáticos e intracelulares de homocisteína são mantidos dentro de limites adequados pela harmoniosa interação entre as enzimas que participam de sua via metabólica e os níveis de vitamina B₁₂ e, principalmente, folato. Inúmeras doenças têm sido associadas a níveis elevados de homocisteína, com destaque para os defeitos de fechamento do tubo neural e os defeitos cardíacos congênitos (DCC). Embora se reconheça que quadros isolados de DCC possuem origem multifatorial, existem evidências de que anormalidades associadas ao metabolismo do folato parecem ser responsáveis por parte destas malformações. Observou-se aumento dos níveis de homocisteína no soro e líquido amniótico de mães de crianças com DCC e a administração periconcepcional de ácido fólico e multivitaminas reduz o risco desse grupo de doenças (Galdieri 2004).

A cisteína é um aminoácido não essencial utilizado na biossíntese de glutathione, proteínas, coenzima A, taurina e enxofre inorgânico. A glutathione ganha importância por se tratar de um antioxidante natural o qual protege as células de fenômenos oxidativos decorrentes da ação de espécies reativas de oxigênio ou ROS(*reactive oxygen species*)(Werder 2010).

Particularizando o processo de metilação do DNA, a S-adenosilmetionina (SAM) se transforma na S-adenosilhomocisteína (SAH) ao transferir grupos metil (-CH₃) para a citosina. Nessas reações catalisadas pelas enzimas DNA metiltransferases (DNMTs), os grupos -CH₃ estabelecem ligações covalentes com os átomos de carbono das posições 5' dos anéis das citosinas, dando origem às 5'-metilcitosinas. As citosinas que funcionam com alvos principais da metilação são aquelas encontradas nos dinucleotídeos CpG (*Cytosine-phosphate-Guanine*), embora se admita que possa existir significativa metilação nas citosinas isoladas pelo menos em tipos de células pluripotentes e oócitos (Ramsahoye *et al.* 2000; Zilller *et al.* 2011). Os dinucleotídeos CpG estão dispersos no genoma. Em regiões distintas dos genes, agrupam-se, constituindo as chamadas ilhas ou ilhotas CpG (CGIs - *Cytosine-Guanine-Islands*), onde exibem frequência cinco vezes maior que no genoma como um todo (Figura 16) (Bird 1986; Gardiner-Garden e Frommer 1987).

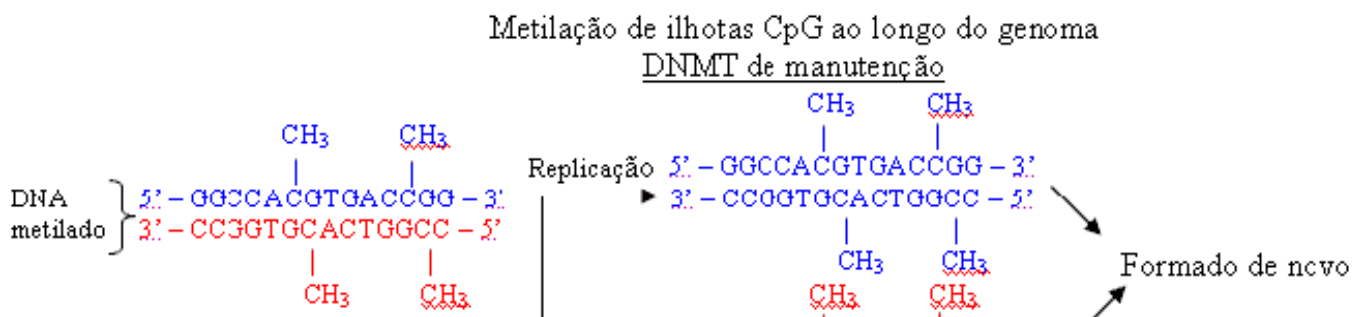


Figura 19. Metilação de ilhotas CpG ao longo do genoma.

Fonte: Dias Correia e Correia (2007).

A ilha CpG consiste de um segmento de DNA de 200 bp, com um conteúdo de CG maior que 50% e um resultado da divisão do número observado de CpG pelo número esperado de CpG maior que 0,6. Este conceito de ilha CpG, ainda utilizado, foi proposto por Gardiner-Garden e Frommer (1987). A identificação de potenciais regiões de ilhas CpG em sequências genômicas, utiliza uma janela de 200 bp movendo-se através da sequência com intervalo de 1 pb. Este método foi descrito pelos mesmos autores (Gardiner-Garden e Frommer, 1987).

1.4.2 HIPOVITAMINOSES B₆, B₁₂ E METILAÇÃO DO DNA

Em condições normais, as vias metabólicas da homocisteína envolvem a remetilação para metionina e a trans-sulfuração para cistationina, a primeira ocorrendo no cérebro e no corpo, promovendo reações homeostáticas de metilação e mantendo as células saudáveis a segunda, predominantemente no corpo. Nas condições adversas de hipovitaminose B (piridoxina e cobalamina), a elevação dos níveis de Hcy favorece outro caminho metabólico, qual seja a S-adenosilização reversível para S-adenosilhomocisteína (Garcia e Zanibbi 2004). A reversibilidade para SAH promove aumento da concentração desse produto com alcance de inibir as reações biológicas de metilação de DNA, RNA e proteínas, traduzindo um *status* de hipometilação (Tchantchou *et al.* 2008; Werder 2010). A deficiência de piridoxina parece exercer adicionalmente um bloqueio na ação da SAHH que impede a transformação da SAH (Eloranta *et al.* 1976; Nguyen *et al.* 2001). Portanto, as hipovitaminoses B₆ e B₁₂, associadas ou não, podem estar relacionadas à hiperhomocisteinemia e ao estado de hipometilação do DNA (Finkelstein 2007; Werder 2010) e, deste modo, interferir no padrão de metilação de genes específicos,

alterar a expressão desses genes e definir doenças (Figura 16) (Finkelstein 2007; Santos *et al.* 2010).

Estudos *in vitro* e *in vivo* em humanos sugerem que a fisiopatologia da Doença de Alzheimer envolve *status* de hipometilação (Fuso *et al.* 2007), geração de espécies reativas de oxigênio (ROS)(Greilberger *et al.* 2008), ativação do sistema imune (Blasko *et al.* 2004) e desenvolvimento de proteína anômala (Van Dam e Van Gool 2009).O metabolismo da Hcy em níveis elevados está envolvido em cada um destes quatro processos(Werder 2010).

As vitaminas do complexo B são hidrossolúveis e não se acumulam no organismo (exceto a B₁₂). Devem ser supridas, diariamente, através da alimentação, de modo a garantir níveis sanguíneos e teciduais adequados e prevenir quadros de hipovitaminoses. As necessidades diárias da vitamina B₆ estão na ordem de 1,6 – 2,0 mg (adultos) 1,0 – 1,4 mg (crianças) e 0,3 – 0,6 mg (lactentes) (Frank 2002). É encontrada, em maior proporção, em alimentos de origem animal, tais como carnes vermelhas, aves e peixes (Clayton 2006). Entre os alimentos de origem vegetal, destacam-se a batata inglesa, aveia, banana, gérmen de trigo, nozes, sementes de girassol, abacate e grãos integrais. Gestação e amamentação são situações que predispõem à deficiência da piridoxina em crianças em caso de carência nutricional das mães. O álcool diminui o acúmulo hepático e aumenta a excreção urinária da vitamina (Frank 2002).

Em trabalho publicado em 2006, Maihara *et al.* avaliaram os teores de proteínas, lipídios, carboidratos, fibras alimentares e vitaminas em dietas representativas do consumo de alimentos e bebidas de trabalhadores (homens de 19 a 56 anos). Comparando os resultados obtidos com as recomendações nutricionais, verificaram que as dietas atingiram adequação de 100% em carboidratos e 96% em proteínas e lipídios. Em relação às fibras alimentares, a adequação ficou em apenas 4,2%. Quanto às vitaminas, as dietas foram adequadas em B₁ e B₂ e inadequadas em 58% dos casos em relação à piridoxina (Mahiara *et al.* 2006).

A vitamina B₁₂ não é encontrada nos alimentos vegetais. As fontes alimentares são os nutrientes de origem animal, como carne, leite, ovos, peixes e mariscos. Nos países em desenvolvimento, o baixo consumo de alimentos de origem animal é a principal causa de baixos níveis séricos de vitamina B₁₂ em adultos jovens (Allen 2009). A ingestão alimentar recomendada para adultos é de 6 ug/dia, dose suficiente para manter uma concentração plasmática adequada(Bohr *et al.*2006). A causa mais

comum de deficiência de cobalamina em lactentes e crianças jovens é a insuficiência da vitamina na dieta materna (Rosenblatt e Whitehead 1999; Muhammad *et al.* 2003). No entanto, a hipovitaminose B₁₂ não é tão comum na população jovem pela propriedade de ser armazenada nos músculos e fígado (Higdon 2009; Reynolds 2012; <http://lpi.oregonstate.edu/infocenter/vitamins/vitaminB12/>), exceto para indivíduos que adotam baixa dieta protéica ou consumidores estritos de dieta vegetariana. Ao contrário, é muito frequente na população idosa (> 50 anos) e em indivíduos que apresentam problemas de absorção gastrointestinal. Para esses grupos de risco, a suplementação de cobalamina em formulações farmacêuticas é requerida (Higdon 2009; Allen 2009). Níveis plasmáticos de B₁₂ entre 201 a 350 pg/mL indicam depleção. Podem ocorrer sintomas de deficiência mesmo com vitamina B₁₂ dentro de níveis normais. Outras vezes, os pacientes permanecem assintomáticos por longos períodos, evoluindo para deficiência crônica (níveis plasmáticos abaixo de 200 pg/mL). A deficiência pode desencadear manifestações neurológicas irreversíveis tipo demência (Werder 2010).

1.4.3 PADRÃO DE METILAÇÃO DO DNA EM NORMAIS E EM PACIENTES HUNTER

Em células não embrionárias humanas, sob condições metabólicas normais, 80% dos dinucleotídeos CpG dispersos no genoma encontram-se metilados, enquanto que os dinucleotídeos CpG das ilhotas CpG permanecem não metilados em todos os momentos, independentemente da expressão do gene (Jaenisch e Bird 2003). As ilhotas CpG (CGIs) estão associadas a dois terços das regiões promotoras dos genes (Adachi e Lieber 2002; Illingworth e Bird 2009). Nas regiões promotoras, segmentos específicos localizados a montante dos genes e que regulam a transcrição do material genético, os dinucleotídeos CpG não metilados atuam como sítios de ligação a diversas proteínas, fatores de transcrição e RNA-polimerase (Blackledge *et al.* 2010; Thomson *et al.* 2010). Nas palavras de Robertson (2001), é justamente na região do promotor que os diversos fatores transcricionais se acoplam a domínios de ligação específicos para dar início à produção de RNA mensageiro (RNAm), a partir da sequência do DNA. Em alguns casos específicos, ilhas CpG podem tornar-se metiladas durante o desenvolvimento, levando ao encerramento, a longo prazo, da expressão do gene associado. Como ilhas CpG permanecem livres de metilação em um genoma globalmente metilado, é uma questão ainda em aberto

(Jaenisch e Bird 2003). Se os fatores de transcrição estão disponíveis e as ilhas CpG permanecerem em um estado não metilado, a transcrição do gene particular poderá ocorrer (Esteller *et al.* 2002). Ao contrário, a metilação das ilhas CpG inibe a transcrição do gene por impedir diretamente a ligação dos fatores de transcrição aos seus sítios de ação. Um segundo mecanismo repressor da transcrição é mediado por proteínas que possuem afinidade pelo radical metil dos sítios CpG metilados e, desta forma, restringem o acesso dos fatores de transcrição (Baylin *et al.* 1998).

Em situações metabólicas anormais, o desequilíbrio no processo de metilação gera sítios com maior ou menor concentração de radicais metil em sequências CpG das ilhotas (Figura 17). A densidade de sítios CpG metilados é proporcional à perda da função da região promotora do gene. A metilação progressiva e cumulativa diminui o nível de expressão, podendo a hipermetilação levar à inativação com silenciamento do gene, embora densidades intermediárias sejam compatíveis com níveis intermediários de supressão transcricional (Dias Correia e Correia 2007).

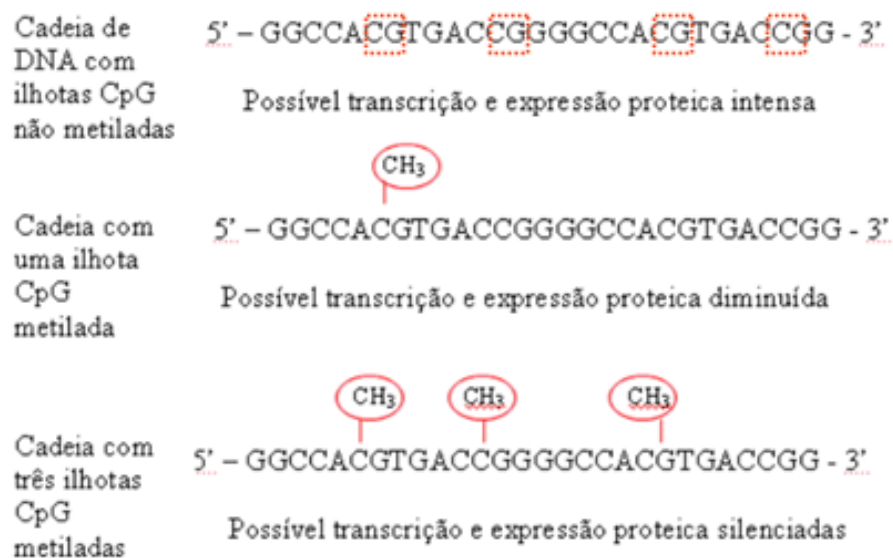


Figura 20. Metilação progressiva das ilhotas CpG e silenciamento do gene.

Fonte: Dias Correia e Correia (2007).

Tomatsu *et al.* (2004), ao compararem genes IDS de controles normais e de pacientes com doença de Hunter, obtiveram a primeira evidência de uma clara diferença no padrão de metilação em certos sítios CpG. No geral, verificaram que os pacientes Hunter tinham uma percentagem de metilação mais alta comparada com a de controles normais. Os sítios específicos de CpG em áreas de éxons com uma mutação de transição eram mais metilados em pacientes Hunter, enquanto os sítios CpG em éxons de controles normais estavam hipometilados. De acordo com

Tomatsu *et al.* (2006), algumas dúvidas ainda permanecem. O que determina as diferenças individuais no padrão de metilação global de certas regiões genômicas equivalentes do IDS que parece ser polimórfico? Como é a frequência da hipermetilação nos éxons do gene IDS na população normal? Os autores recomendam um estudo mais abrangente com maior número de pacientes e análise mais ampla do padrão de metilação que contemple outros sítios do gene IDS.

Não existe registro de estudo comparando o padrão de metilação de um gene causador de doença em doentes e controles normais, exceto na genética oncológica humana, onde o fenômeno do silenciamento epigenético está bem documentado. O câncer é um processo em que erros genéticos e epigenéticos se acumulam e transformam células normais em células tumorais invasivas ou metastáticas. As alterações nos padrões de metilação do DNA mudam a expressão de genes supressores tumorais e de oncogenes (Rodenhiser e Mann 2006). A inativação transcricional de genes supressores de tumor, pela hipermetilação em regiões promotoras, é um importante mecanismo carcinogênico e pode representar uma causa mais frequente de câncer do que as mutações pontuais não silenciosas naqueles genes. Os genes VHL, BRCA1 e STK11 são exemplos conhecidos de supressores de tumor ao regular o ciclo celular e prevenir a proliferação descontrolada através da codificação de complexos protéicos específicos. Mutações germinativas nesses genes causam formas familiares de câncer renal, de mama e de cólon, respectivamente. Os mesmos genes sem mutações são, frequentemente, silenciados epigeneticamente em formas esporádicas destes tumores. Por exemplo, o gene BRCA1 (*breast cancer 1, early onset*) não é importante apenas para o câncer familiar da mama. Em torno de 10% a 15% das mulheres com câncer da mama não familiar tem tumores nos quais o gene BRCA1 está hipermetilado (McKusick 2007). A aceleração do processo carcinogênico também pode ocorrer pela hipometilação de regiões promotoras de proto-oncogenes, que pode levar à sua ativação. A hipometilação do DNA também se relaciona com a redução da capacidade de reparo dessa molécula e instabilidade de microssatélites. Uma proporção significativa de carcinomas com etiologia associada a deficiências na maquinaria de reparo do DNA, frequentemente, exibe instabilidade de microssatélites (Pavarino 2012). Os estudos que envolvem a hipermetilação em regiões promotoras de genes supressores de tumor e hipometilação de regiões promotoras de proto-oncogenes lançam luz às evidências de que a dieta é um dos mais importantes determinantes na modificação do risco de desenvolvimento de

câncer, na medida em que os componentes bioativos podem, seletivamente, inibir ou ativar a expressão gênica (Antunes 2008).

1.4.4 MUTAÇÕES TRANSACIONAIS NO GENE IDS

Uma das propriedades mais importantes relacionadas à metilação do DNA em regiões CpG (Figura 18) é a mutabilidade (Illingworth e Bird 2009; Blackledge e Klose 2011). Ao contrário das mutações que são fenômenos de grande estabilidade, as modificações epigenéticas representadas pela metilação são constantemente afetadas por fatores ambientais e estilo de vida.

A transformação das citosinas em 5'-metilcitosinas atua como um dos principais contribuintes de um tipo específico de mutação de transição nos nucleotídeos CpG, que não é corrigida por mecanismos de reparo do DNA. Essa mutação pontual pode ser compreendida pelo mecanismo espontâneo de substituição de um grupamento $-NH_2$ por uma $-OH$ na molécula de 5'-metilcitosina, transformando-a em timina. Neste processo denominado desaminação (Figura 18), ocorre a troca de uma pirimidina por outra pirimidina (citosina em timina ou $C \rightarrow T$) e de uma purina por outra purina (guanina em adenina ou $G \rightarrow A$), podendo levar à doença genética (Cooper e Youssoufian 1988; Bottema *et al.* 1993; Meissner *et al.* 2008). As mutações pontuais transacionais são 25 vezes mais frequentes que qualquer outra mutação de um único nucleotídeo. Isto transforma os dinucleotídeos CpG nos chamados *hot spots*, por representar verdadeiros “pontos quentes” para as mutações no genoma humano.

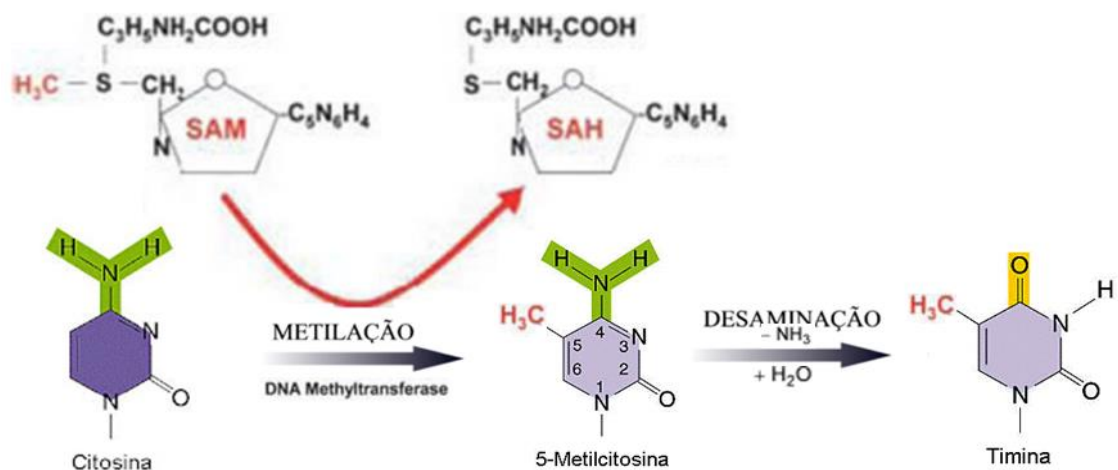


Figura 21. Metilação da citosina e desaminação.

Fonte: Attwood et al. 2002; Dias Correia e Correia (2007), modificado.

De acordo com Rathmann *et al.* (1996), as mutações pontuais isoladas que ocorrem dentro de dinucleótidos CpG dos genes IDS, resultado de transições C → T e o correspondente G → A (transição na cadeia oposta), são observadas em 80% dos casos de D. de Hunter e constitui cerca de 47% das mutações pontuais dos sítios CpG causadoras dessa doença. Quanto às mutações pontuais recorrentes, quase todas envolvem sítios CpG. No genoma humano como um todo, as transições C → T / G → A nos dinucleótidos CpG, são estimadas em 30 a 40% das mutações pontuais isoladas (D'Cruz *et al.* 2000). Os resultados indicam que a incidência de eventos mutacionais de transição em sítios CpG do gene IDS superam o esperado em cerca de 30 vezes. Fica evidente a importância da metilação da citosina CpG predispondo mutação de transição C para T / G para A no gene IDS e o maior risco de mutações para os indivíduos que herdam maior padrão de metilação no gene considerado (Tomatsu *et al.* 2006). As mutações no gene IDS podem alterar a expressão do gene e definir ausência ou baixa atividade metabólica da enzima IDS, a causa da Síndrome de Hunter. A metilação do DNA que ocorre no DNA genômico pode modificar a expressão do gene IDS e interferir no fenótipo dos portadores de Hunter (Armandola 2004).

É improvável que se possa produzir prova direta de que sítios CpG em pacientes Hunter foram realmente metilados antes da introdução da mutação, uma vez que a alteração de nucleotídeos que conduz à doença já teria ocorrido. No entanto, o estado de alta metilação nos locais circundantes nos sítios CpG, em comparação com os controles normais, sugere que a metilação desta região precede a mutação e pode ter predisposto para mutações de transição CpG.

1.4.5 O MANGANÊS COMO COFATOR DA ENZIMA IDS

A via metabólica através da qual uma enzima catalisa a conversão de um substrato em um produto pode ser bloqueada em qualquer etapa se a enzima considerada está funcionalmente alterada. Modificações pós-traducionais que podem alterar a funcionalidade da enzima IDS incluem a degradação acelerada, a absorção intestinal deficiente, a alteração no sítio ativo de ligação e a deficiência de cofatores enzimáticos por carência nutricional.

Cofatores são componentes não-proteicos essenciais à integridade estrutural da proteína e requeridos para a ativação da apoenzima transformada na holoenzima. As coenzimas constituem cofatores dissociáveis representados por compostos orgânicos não proteicos com destaque para as vitaminas. Os grupos prostéticos são cofatores não dissociáveis da enzima por se encontrarem ligados firmemente à cadeia polipeptídica, muitas vezes através de ligações covalentes. São representados por cátions ativos de metais alcalinos terrosos e metais de transição, em vários estados de oxidação. Permanecem, de algum modo, ligados ao centro (sítio) ativo situado na superfície da proteína, resultado de um arranjo de radicais presentes nas cadeias laterais de AA (Wong e Whitesides 1994). O sítio ativo funciona como um centro de ligação capaz de estabelecer ligações não covalentes com o substrato para formar o complexo enzima-substrato.

Os metais requeridos para a funcionalidade da “superfamília fosfatase alcalina” incluem o Mg, Ca, Mn, Co e Zn. Na situação de deficiência de determinado cofator, as moléculas da enzima não se dobras de modo peculiar ou se tornam instáveis. Galperin *et al.* (2008) propuseram o Mg (Mg^{++}) como cofator da arilsulfatase A humana (ARSAh) e o Ca (Ca^{++}) como possível cofator para a enzima arilsulfatase B humana ARSBh. Para a enzima IDSh, nenhum metal foi sugerido (*not determined ou n.d.*) (Tabela 1).

Tabela 1. Propriedades das sulfatases da superfamília fosfatase alcalina.

Enzima (EC No.)	Simbologia	pH para ação otimizada	Metal requerido	Doença humana causada por uma mutação
N-acetilgalactosamina 6-sulfatase (EC 3.1.6.4)	GA6S_HUMAN	3,5 – 4,0	n.d	MPS tipo IV (Síndrome de Morquio A)
Cerebroside sulfatase (EC 3.1.6.8)	ARSA_HUMAN	4,8 – 6,2	Mg	Leucodistrofia metacromática
N-acetilgalactosamina 4-sulfatase (EC 3.1.6.12)	ARSB_HUMAN	n.d	Ca?	MPS tipo VI (Síndrome de Maroteaux-Lamy)
N-acetilgalactosamina 6-sulfatase (EC 3.1.6.14)	GL6S_HUMAN	3,9 - 5,7	n.d	MPS tipo III D (Síndrome de Sanfilippo D)
N-sulfoglucosamina sulfatase (EC 3.10.1.1)	SPHM_HUMAN	3,9 – 4,1	n.d	MPS tipo III A (Síndrome de Sanfilippo A)

Iduronato 2-sulfatase (EC 3.1.6.13)	IDS_HUMAN	4,0 – 5,7	n.d	MPS tipo II (Síndrome de Hunter)
--	-----------	-----------	-----	----------------------------------

Fonte: Galperin *et al.* (1998).

Considerando a semelhança existente entre a estrutura do centro ativo da enzima IDS humana com os centros ativos das enzimas ARSA e ARSB humanas, por similaridade, o cátion Ca^{++} poderia atuar também como cofator da IDS (na proporção de um cátion por subunidade). Alguns autores confirmam que a IDS h requer a presença de um cátion divalente que atue como cofator ligado permanentemente ao sítio ativo. Os cátions divalentes de cálcio e do zinco foram estudados. Com raios iônicos de 114 e 104 pm, respectivamente, não apresentaram as dimensões apropriadas. O cátion Mn^{++} , com um raio de 81 picômetros (pm), foi o único que se encaixou perfeitamente ao modelo. Keen *et al.* (1984), Saenz *et al.* (2007) defendem que este cátion seria o Mn^{++} e não o Ca^{++} . A forma química biologicamente ativa é o Mn^{++} . O metal nos demais números de oxidação apresenta toxicidade.

Para a predição da estrutura terciária da enzima IDS humana, cujo modelo teórico pode ser analisado na Figura 22, Saenz *et al.* (2007) utilizaram programas capazes de elaborar modelos tridimensionais. O modelo final apresentou 33,3% em hélice, 7,2% em α , percentagens similares àquelas



Figura 22. Predição da estrutura terciária da IDS humana, com a localização do Mn^{++} no sítio ativo da enzima.

Fonte: Saenz *et al.* (2007).

A remoção do Mn^{++} pode alterar a estrutura tridimensional da molécula com reflexos previsíveis na atividade enzimática. Foi demonstrado que, quando os níveis desse cátion estão baixos, a atividade da enzima IDS h também diminui (Keen *et al.*

1984; Saenz *et al.* 2007). Esses resultados permitem supor que a disponibilidade de Mn^{++} em níveis adequados no ambiente intracelular possa representar outro fator de garantia da funcionalidade da enzima IDS. Para tanto, os níveis plasmáticos do metal devem ser mantidos dentro dos limites da normalidade. Evidências reforçam o papel metabólico do Mn^{++} . Aparece como cofator de uma grande variedade de enzimas: oxidorreduções, transferases, isomerases, hidrolases e outras (Keen *et al.* 1984). É micronutriente essencial para a síntese do colesterol, do neuro-transmissor dopamina e para o crescimento e o desenvolvimento normal de ossos e cartilagens. Em humanos, é essencial para a utilização das vitaminas do complexo B (Hurley 1981).

O suprimento de Mn depende da qualidade da dieta alimentar. Maiores concentrações do metal são encontradas em nozes, grãos de cereais, legumes e frutas. Baixos níveis existem no leite e seus derivados, carne bovina, peixes e ovos. Chás de folhas vegetais são fontes significativas (WHO 1999). A deficiência de manganês em culturas de cereais tem aumentado nos últimos anos. O fato coincide com o aumento da concentração de fósforo (P) em muitos solos destinados à agricultura, devido à aplicação exagerada de fertilizantes fosfatados (Pedas *et al.* 2011). Níveis diários de ingestão alimentar têm sido estabelecidos pelas autoridades sanitárias como um esforço para assegurar boa saúde. Para Martins e Lima (2001), níveis de ingestão diária da ordem de 2 a 5 mg para adultos são satisfatórios (Martins e Lima 2001). A deficiência de Mn^{++} parece ser incomum em humanos, o que se credita aos mecanismos eficientes de controle homeostático (World Health Organization. Manganese. Geneva, 1981). Os mecanismos de absorção e excreção são bem desenvolvidos. A eliminação, especialmente a secreção biliar, é o principal fator da manutenção da homeostase do Mn no organismo, de modo a manter os níveis teciduais e plasmáticos dentro de estritas faixas de variação (The Manganese Health Research Program (MHRP) - International Manganese Institute (IMnI) June 2009. <http://www.manganese-health.org/>). Conforme experimentos clássicos conduzidos por Barceloux (1999), os níveis do Mn no sangue total variam de 4 a 15 ng/mL (média de 9 ng/mL), o que equivale a 0,8 a 3,75 ng/mL no soro (média de ng/mL), considerando que a concentração nos eritrócitos é cerca de 5 vezes mais elevada (Gerber *et al.* 2002).

O Mn^{++} atravessa a barreira placentária e supre as necessidades do concepto. No entanto, os fetos não acumulam o metal. O leite materno contém o produto que é bem absorvido pelos lactentes. Formulações lácteas de uso pediátrico contém

concentrações do metal até 200 vezes maiores que o leite materno, mas a absorção é 10 vezes menor (Roels *et al.* 1987; Barceloux 1999; Gerber *et al.* 2002). A deficiência de Mn produz anormalidades esqueléticas nos indivíduos (Barceloux 1999). Os raros casos de intoxicação crônica descritos em adultos causaram o “manganismo,” quadro clínico no qual sobressai a síndrome extrapiramidal ou parkinsoniana em decorrência da diminuição da dopamina nos núcleos da base, sobretudo no corpo estriado (WHO 1999).

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Estabelecer protocolo simplificado para identificação de portadores de MPS II e heterozigotos, utilizando ferramentas moleculares em reforço aos critérios bioquímicos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Caracterizar o padrão mutacional do gene IDS em pacientes amazonenses de descendência indígena.

Validar a utilização de métodos de biologia molecular na identificação do perfil heterozigo e permitir o aconselhamento genético de nulíparas.

Analisar a variabilidade clínica pela interferência de fatores nutricionais na expressão do gene IDS mutante.

Firmar as bases teórico/práticas para o emprego da biologia molecular em genética humana no Amazonas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ASPECTOS ÉTICOS

A aprovação para a realização do presente trabalho foi expedida pelo Comitê de Ética em Pesquisa Humana da Universidade Nilton Lins, conforme certificado nº. 20, de 26/05/2010. Todos os participantes do estudo foram devidamente informados dos objetivos e métodos da pesquisa. As genitoras dos pacientes, individualmente, como participantes diretas, assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (Modelo TCLE - Anexo 4) e outro em nome dos pacientes e menores de idade sob sua responsabilidade.

3.2 SUJEITOS DA PESQUISA

No presente trabalho, foram incluídos 05 portadores de Mucopolissacaridose tipo II (síndrome de Hunter), de 5 a 15 anos de idade, membros de quatro famílias amazonenses sem qualquer parentesco, de forte etnia indígena, somados a 17 familiares do sexo feminino e 02 familiares do sexo masculino, sem a doença.

O quadro 04 relaciona todos os sujeitos da pesquisa identificados conforme se procedeu nas amostras de laboratório.

Pacientes:

- Paciente 1 (família A), forma atenuada, comprovação enzimática, sob terapia de reposição enzimática (TRE).
- Paciente 2 (família B), forma grave, comprovação enzimática, sob TRE; tio com a forma grave (falecido).
- Paciente 3 (família C), forma atenuada, comprovação enzimática, sob TRE e Paciente 5, forma grave, sem TRE; tio com a forma grave (falecido).
- Paciente 4 (família D), forma grave, dosagens enzimáticas consideradas não conclusivas.
- Paciente 6 (família E), forma grave, comprovação enzimática, fez TRE (falecido).

Os dados clínicos dos pacientes podem ser apreciados no Anexo 05. O paciente 4, embora apresentasse fenótipo compatível com a forma grave de MPS II, não teve as dosagens enzimáticas consideradas conclusivas pelos critérios vigentes (resultados próximos dos valores mínimos de referência).

Familiares:

Foram incluídas as genitoras assintomáticas (portadoras do alelo mutante) e outros familiares do sexo feminino com proximidade parental, alguns possíveis portadores da mutação. Um sobrinho e um primo de pacientes, não Hunter, foram admitidos para atuar como normais/controle.

Quadro 04. Sujeitos da pesquisa – pacientes e familiares

Pacientes (P)	Familiares
P 1 (DN: 08/04/1998)	1M (Mãe); 1 I C (Irmã); 1 I S (Irmã); 1 I L (Irmã); 1 LY (sobrinho, filho de I L)
P 2 (DN: 12/09/2000)	2M (Mãe); 2T1 (Tia); 2T2 (Tia)
P 3 (DN:08/04/2005)	3M (Mãe); 3 I (Irmã); 3 P (Prima); 3 PL (Primo)
P 4 (DN: 04/06/2000)	4M (Mãe); 4 A (Avó); 4T1 (Tia); 4T2 (Tia); 4P1 (Prima)
P 5 (DN: 01/04/2000)	5 M (Mãe); 5 I (Irmã)

Pacientes – P; DN: Data de Nascimento.

Critérios de Inclusão de pacientes:

Foram incluídos no estudo indivíduos com diagnóstico confirmado de MPS II através das dosagens enzimáticas específicas realizadas no centro de referência (Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo do Hospital das Clínicas de Porto Alegre). As genitoras, irmãs e tias de qualquer idade, gestantes ou não, também foram admitidas para os testes genéticos realizados nos Laboratórios de Biologia Molecular da Universidade Nilton Lins.

Critérios de exclusão de pacientes:

Um único paciente (paciente 6), foi excluído do estudo por motivo de falecimento antes do início dos testes de biologia molecular. Nenhum paciente foi excluído por vontade declarada de seus pais ou responsáveis.

3.3 MATERIAL E MÉTODOS EMPREGADOS

Urina para dosar GAGs.

- Amostras de urina (30 a 50 ml) - coletadas a qualquer hora do dia e acondicionadas em frascos estéreis de plástico com tampa hermética fornecida pelo laboratório de referência. Mantidas refrigeradas em gelo reciclável, foram entregues para processamento no prazo máximo de 48 horas;
- Sangue para dosar a enzima IDS.

Amostras de sangue de 8 a 10 ml - obtidas por punção de veia periférica, utilizando tubo tipo *Vacutainer* já heparinizado (*kits* de coleta de material biológico fornecidos pelo laboratório de referência). Acondicionadas em ambiente refrigerado com gelo reciclável, foram entregues para processamento no prazo máximo de 48 horas;

- Sangue para dosar Vitaminas B₆, B₁₂ e Manganês.

Amostras de sangue de 20 mL e 10 mL para as vitaminas e Mn, respectivamente, foram obtidas por punção de veia periférica, utilizando tubo tipo *Vacutainer* heparinizado. O material foi mantido resfriado e longe da luz durante o transporte e armazenamento;

- Sangue para estudos de biologia molecular.

Amostras de sangue de 8 a 10 ml foram obtidas por punção de veia periférica, utilizando seringa descartável de plástico com agulha montada,

previamente heparinizada (0,5 ml de heparina) ou diretamente em tubo tipo Vacutainer heparinizado, tendo o cuidado de inverter a posição do tubo por diversas vezes para solubilizar o anticoagulante. O material coletado foi mantido resfriado e longe da luz durante o transporte e armazenado em geladeira (não congelado) até o processamento.

Os pacientes e familiares foram atendidos no Ambulatório de Endocrinologia da Fundação Hospital Adriano Jorge. Neste hospital está instalado o Centro de Referência em Diagnóstico e Tratamento das Mucopolissacaridoses. Os dados clínicos colhidos incluíram a identificação, anamnese e exame físico. Exames laboratoriais de rotina e imagens foram realizados na mesma instituição (Anexo 4).

A metodologia foi desenvolvida sob a ótica da genética clínica, bioquímica e biologia molecular. Destaque para o emprego inaugural em nosso meio, de técnicas de biologia molecular úteis para o diagnóstico preciso de enfermidades genéticas em humanos clinicamente suspeitos.

Em busca da padronização de procedimentos, todos os testes enzimáticos específicos, incluindo as dosagens de GAGs, foram realizados no Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo (LEIM) do Serviço de Genética Médica – Hospital das Clínicas de Porto Alegre – RS, da Rede MPS- Brasil, (redempsbrasil@ufrgs.br), referência em erros inatos do metabolismo. Em algumas ocasiões, no estabelecimento do diagnóstico diferencial, outras enzimas referentes às demais MPSs foram dosadas na mesma amostra. O processamento do material biológico – coleta, acondicionamento e transporte - obedeceu aos protocolos estabelecidos e utilizou *kits* fornecidos pelo laboratório citado. As dificuldades logísticas para a remessa e tramitação alfandegária impuseram, a custos elevados, a contratação de empresa especializada em logística de material biológico e correlatos, credenciada pela ANVISA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

A cidade de São Paulo conta com outro laboratório de capacitado, o CREIM – Centro de Referência em Erros Inatos do Metabolismo, do Centro de Genética Médica da UNIFESP (creim@pediatria.epm.br), o qual já foi utilizado para investigação de outras formas de DDL.

As dosagens requeridas de vitaminas B₆ e B₁₂ e de manganês foram feitas nos Laboratórios de Bioquímica da USP - Ribeirão Preto.

3.3.1 PROTOCOLOS PARA OS ESTUDOS BIOQUÍMICOS

3.3.1.1 DOSAGEM DA ENZIMA IDS

Para as dosagens de iduronato-sulfatase em amostras de plasma e leucócitos o laboratório de referência emprega a técnica de análise fluorimétrica (Voznyi *et al.* 2001).

3.3.1.2 DOSAGEM DAS VITAMINAS B₆ E B₁₂

O protocolo escolhido nesta tese copia os métodos definidos e os resultados das experimentações conduzidas por Steluti *et al.* (2011), cuja população de estudo foi constituída de 99 adolescentes saudáveis de 16 a 19 anos (média de idade de 17,6 anos), 58,6% do sexo feminino, naturais e residentes no interior do estado de São Paulo (SP). Os valores das concentrações séricas de B₆ e B₁₂: 18,7 (DP 5,1) nmol/L e 397,5 (DP 188,4) pg/mL, respectivamente. Os resultados deste estudo foram pouco inferiores àqueles de estudos americanos similares: concentração sérica de B₁₂ de 504 pg/mL entre adolescentes de 12 a 19 anos (Pfeiffer *et al.* 2007) e de 37 nmol/L de B₆ na população de 13 a 20 anos de idade (Morris *et al.* 2008). Para as análises bioquímicas as amostras de 20 mL de sangue foram coletadas por punção de veia periférica, ao final de jejum estimado em 12 horas (liberado o jantar até as 20:00 h da véspera). As amostras foram centrifugadas a 2.000 rpm durante 10 minutos em temperatura ambiente. Os plasmas foram separados e armazenados a - 80 °C, enquanto aguardavam o destino final. As dosagens de B₁₂ foram determinadas no sistema automático de imunoanálise Elecsys® 2010 Rack Version (Roche Diagnostics GmbH, D-68298, Suíça) pelo método de imunoensaio de eletroquimioluminescência, utilizando os *kits* de teste de Vitamin B₁₂ (Elecsys and cobas analyzers, Roche Diagnostics). As dosagens de B₆ foram realizadas no sistema HPLC-Analytik da ImmunDiagnostik AG®, pelo método de cromatografia líquida de alta resolução (HPLC), por detecção fluorimétrica.

3.3.1.3 DOSAGEM DO MANGANÊS

A técnica analítica utilizada para a determinação do manganês no soro foi a espectrometria de absorção atômica, a partir de amostras de 10 mL de sangue total colhido de veia periférica em tubo heparinizado, conforme protocolo recomendado pelo National Institute of Occupational and Safety Health (NIOSH 2000), e uma solução padrão de Mn (Merck) como controle. Os procedimentos empregaram um

espectrofotômetro de absorção atômica eletrotérmico tipo Perkin-Elmer (AAAnalist 300), equipado com forno de grafite.

3.3.2 PROTOCOLOS PARA OS ESTUDOS EM BIOLOGIA MOLECULAR

Os estudos de biologia molecular, incluindo o sequenciamento do éxon 9 do gene IDS, foram realizados nos Laboratórios de Genética Química, Bioinformática e Expressão Gênica da Universidade Nilton Lins, Manaus - AM. Para a pesquisa de mutações pela análise de MELT de alta resolução (HRM) foi utilizado o Rotor-Gene Q, da Qiagen Instruments instalado no Laboratório de Biologia Molecular da Universidade Federal de Rondônia (UNIR), em Porto Velho – RO.

3.3.2.1 EXTRAÇÃO DO RNA

O RNA total foi extraído das amostras de sangue (leucócitos), utilizando o reagente Trizol (Invitrogen), conforme as instruções do fabricante. Visando a total eliminação do presumível DNA genômico contaminante, o RNA total foi tratado, em reação repetida, com DNAase I (Promega) na proporção de 10 U de enzima para 50 µg de RNA. O processo de eletroforese em gel de agarose 1% (m/v) corado com brometo de etídio, confirmou extração e integridade do RNA. O RNA foi visualizado em transiluminador de luz UV e fotografado em fotodocumentador Kodak Gel Logic 100®. A quantidade de RNA obtida foi quantificada em NanoDrop 1000 (Thermo Scientific). Para a obtenção do cDNA utilizou-se a enzima M-MLV Invitrogen. Os oligonucleotídeos empregados nas amplificações (Tabela 2) foram desenhados a partir da consulta do GenBank e por comparação filogenética com a utilização do Web Primer (<http://www.yeastgenome.org/cgi-bin/web-primer>), e do Geneious PRO 4.8 (<http://www.geneious.com/>).

Tabela 02. Oligonucleotídeos utilizados na PCR do gene IDS_h

IXa-5'	5' TGG CAG GCT TTT ATA ATG 3'
IXa-3'	5' AGG TAC GGA TCC TCT TCC 3'
IXb-5'	5' GAG CTG TGC AGA GAA GGC 3'
IXb-3'	5' TGA AGC CAA CCC ACA CAG 3'
IXc-5'	5' GAT ATA AAG ATC ATG GGC 3'

IXc-3'	5' TCT CAC CAG CTG GAA GGG 3'
--------	-------------------------------

Fonte: (<http://www.geneious.com/>).

3.3.2.2 qPCR

A PCR em Tempo Real ou PCR quantitativa ou qPCR utilizada neste estudo para a quantificação de expressão gênica, emprega a metodologia de PCR convencional e um sistema de detecção de sinais fluorescentes que permite a detecção, quantificação e amplificação de DNA em uma única etapa.

Para a Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (qPCR) foi utilizado o termociclador ABI-7300 Fast-Real Time PCR Systems (Applied Biosystem, Foster, CA, USA) e o kit SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystem, Foster, CA, USA), conforme o protocolo do fabricante. As reações de qPCR foram preparadas com a utilização de 8 uL de SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystem, Foster, CA, USA), 1 uL do primer 1 (100mM), 1 uL do primer 2 (100 mM) e 1 µg/µL do cDNA da amostra. O ciclo dado à reação foi: 1 ciclo a 50° C por 2 minutos, 1 ciclo de 95° C por 10 minutos e 40 ciclos de 95° C por 15 segundos e de 60° C por 1 minuto. Todas as reações foram feitas em triplicata. *Baseline e threshold* foram obtidos, automaticamente, com o uso do *software* de análise ABI Prism 7300 SDS versão 1.3.1.A eficiência da reação foi estimada pelo cálculo da curva padrão, a partir de uma serie de diluições de cDNA (100 ng/µL a 10fg/µL). Todos os cálculos foram feitos pela determinação da Ct (*cycle threshold*).

3.3.2.3 EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO PARA HRM

A extração de DNA genômico de amostras de sangue total foi feita mediante a utilização da técnica rápida de precipitação com NaOH e neutralizado com solução Tris HCl pH 8,0. A extração e integridade do DNA foram confirmadas com eletroforese em gel de agarose 1% (m/v) corado com brometo de etídio. O DNA foi visualizado em transiluminador de luz UV e fotografado em fotodocumentador

Kodak Gel Logic 100®. A quantidade de DNA obtida foi quantificada em NanoDrop 1000 (Thermo Scientific).

3.3.2.4 EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO PARA SEQUENCIAMENTO

A extração do DNA genômico para o sequenciamento foi feito utilizando o kit DNA-Wizard Genomic da Promega, para o qual foram seguidas as instruções do fabricante. A extração e integridade do DNA foram confirmadas com eletroforese em gel de agarose 1% (m/v), corado com brometo de etídio. O DNA foi visualizado em transiluminador de luz UV e fotografado em fotodocumentador Kodak Gel Logic 100®. A quantidade de DNA obtida foi quantificada em NanoDrop 1000 (Thermo Scientific).

3.3.2.5 SEQUENCIAMENTO DO DNA

Para o sequenciamento do DNA foi utilizada a metodologia de Sanger, conforme protocolo firmado para o reagente Big Dye V3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA). As reações foram preparadas com DNA molde (cDNA, DNA) 20ng, primer 3,2 pmol, tampão 8 µL, BigDye terminator 2 µL e água ultrapura para completar um volume de 20 µL por poço, utilizando placa de 96 poços e com as seguintes temperaturas: 96° C 2 minutos, 39 ciclos de 96° C por 30 segundos, 50° C por 20 segundos e 60° C por 4 minutos. Feita a purificação e precipitação, preparou-se a reação de sequenciamento com a adição de 10 µL de formamida HI-DI (Applied Biosystems), sendo a placa aquecida a 95° C por 5 minutos e levada ao gelo por mais 2 minutos. Utilizou-se o sequenciador automático de 4 capilares ABI 3130 Sequence Analyzer (Applied Biosystems) instalado no laboratório de Genética da Universidade Nilton Lins.

3.3.2.6 USO DO *HIGH RESOLUTION MELTING* NA IDENTIFICAÇÃO DE GENÓTIPOS

A fusão de alta resolução (HRM – *HighResolution Melting*) consiste em uma técnica inovadora baseada na análise da fusão do DNA – temperatura de fusão ou T_m (Zhou *et al.* 2004; Krypuy *et al.* 2006), através da qual torna-se possível identificar diferentes genótipos do DNA genômico e distinguir as amostras dos heterozigotos, dos mutantes e dos controles selvagens e negativos (Erali *et al.* 2008), com base na sequência de pares de bases, comprimento, conteúdo GC e complementaridade. É

utilizada em aplicações de genotipagem, tais como análise de mutações de genes, polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) e em epigenética, na detecção e análise de *status* de metilação de DNA para estudo das mutações somáticas adquiridas ou mudanças no estado de metilação de ilhas CpG (Rotor-Gene - Qiagen Instruments - Manual do usuário 2010). O uso da análise HRM em Medicina humana inclui o diagnóstico de doenças de herança autossômica recessiva, dominante e doenças genéticas ligadas ao cromossomo X, o estudo de mutações no proto-oncogene RET associadas à síndrome denominada neoplasia endócrina múltipla tipo 2 ou MEN2 (Margraf *et al.* 2006), o diagnóstico das síndromes de Prader-Willi e Angelman (White *et al.* 2007) e a detecção da metilação progressiva no promotor do gene BRCA1 que pode estar associada ao desenvolvimento de câncer da mama (Wojdacz e Dobrovic 2007).

A HRM é precedida de PCR em tempo real, de alta precisão, destinada a amplificar as amostras de DNA com as sequências alvo, já que um elevado número de cópias é requerido. A PCR é realizada em um sistema fechado de tubos para prevenir a contaminação dos produtos que são analisados continuamente. As amostras, preferencialmente de obtenção recente, devem ter concentrações mantidas na maior similaridade possível, uma vez que a concentração de um fragmento de DNA interfere na sua temperatura de fusão (T_m). Deve-se ter a garantia de que cada reação tenha amplificado de modo similar (Manual de usuário do Rotor-Gene 2010). Sem esses requisitos, uma PCR de baixa qualidade resulta em HRM de baixa qualidade e respostas não confiáveis.

A PCR *real time* utiliza um corante fluorescente de intercalação (preferência pelo EvaGreen – Qiagen), o qual não interage com o DNA de fita simples (*single-stranded* DNA ou ssDNA), mas intercala ativamente com o DNA de fita dupla (*double-stranded* DNA ou dsDNA) e fluoresce intensamente. As amostras de DNA são caracterizadas de acordo com seu comportamento de dissociação. Inicialmente, a fluorescência é elevada porque as amostras começam como dsDNA. À medida que a temperatura se eleva, a fluorescência diminui na proporção da dissociação do dsDNA dando origem ao ssDNA e liberando o corante de intercalação. O ponto médio da fase de fusão, no qual 50% do DNA está sob a forma de fita dupla, define a temperatura de fusão (T_m) da amostra sob análise. Um componente do equipamento coleta sinais fluorescentes com extrema precisão térmica e óptica e classifica as amostras com base nos seus comportamentos de dissociação na transição de dsDNA para ssDNA. A partir deste dado, uma curva de

fusão é gerada e, automaticamente, analisada. O comportamento de dissociação, ao variar em função do comprimento da sequência, do conteúdo GC, da sequência de DNA complementar e até pela simples mudança de um único par de bases, passa a ser característico de uma determinada amostra de DNA (Rotor-Gene - Qiagen Instruments - Manual do usuário 2010). Os dados gerados podem ser analisados com base na temperatura fusão de DNA (T_m) ou no formato das curvas de fusão que aparecem nos gráficos e fornecem a representação básica dos diferentes genótipos. A normalização permite que sejam comparadas com o mesmo nível de sinal de fluorescência inicial e final, facilitando a interpretação e análise. As curvas atípicas ou de modelos diferentes caracterizam os heterozigotos, enquanto as curvas com desvio caracterizam os homozigotos. Os genótipos são exibidos automaticamente e um grau de confiança (*confidence %*) é fornecido como uma verificação da integridade dos resultados. O valor limiar pode ser editado e um grau de confiança acima de 70% é considerado satisfatório para o diagnóstico. Amostras que caíam para baixo do limiar ajustado serão marcadas como uma variação para nova investigação (Erali e Wittwera 2010). Os procedimentos da análise de fusão de alta resolução transcorrem, em geral em apenas 3 horas, caso amostras mutantes não estejam presentes. Quando amostras variantes são detectadas, a identificação exige 3 horas adicionais (Erali e Wittwera 2010).

Além do elevado grau de confiabilidade, o método HRM oferece as vantagens de envolver procedimentos seguros, de execução simples, mais rápidos e menos onerosos, quando comparado ao sequenciamento de DNA e a outros métodos convencionais de rastreamento (Reed *et al.* 2007; Rotor-Gene - Qiagen Instruments - Manual do usuário 2010).

Neste trabalho, a pesquisa de mutações pela análise de fusão de alta resolução (HRM) utilizou o Rotor-Gene Q da Qiagen Instruments com rotor de 36 poços e o *kit* Type-it HRM PCR da Qiagen® reagentes, conforme metodologia definida pelo fabricante (Qiagen® Instruments – Suíça; importado e distribuído por Qiagen® Biotecnologia Brasil Ltda. Cadastro ANVISA: 10322259004). O *kit* Type-it HRM PCR, adequado para análise de SNPs e mutações, contém o EvaGreen, corante fluorescente intercalante de terceira geração. As reações de HRM-PCR foram preparadas com a utilização de 12,5 uL de Master Mix 2x HRM PCR (Qiagen®), 1,75 uL mix de primers (pares de IX a, IX b e IX c, VIII e III) (100mM), e 50 ng/μL do DNA do template, completando com água livre de RNA para um volume total de 25 uL. O ciclo dado à reação foi: 1 ciclo a 95° C por 5 minutos e

40 ciclos de 95° C por 10 segundos, 55° C por 30 segundos e de 72° C por 10 segundos. A aquisição de dados do HRM foi feita a cada 2 segundos com incrementos de 0,1° C no intervalo de 65 a 95° C. Todas as reações foram feitas em triplicata. Os dados foram analisados utilizando o software de análise HRM (sistema operacional Microsoft Windows XP e processador Pentium IV de 2 GHz com memória principal de 512 MB RAM e espaço de disco rígido de 10 GB, conforme preconiza o Manual do Usuário 2010, do Rotor-Gene Instruments.

Tabela 03. Primers do gene IDSh e temperaturas para o ciclo térmico.

Exon	Primer sequence	Annealing temperature
I-5'	5' CCA CCT GCT GCA GCC TGT CC 3'	
I-3'	5' AGA TGG CAG GGA GGG CGT GG 3'	65°C
II-5'	5' AGG GTT CAG TGT CAG TGC 3'	
II-3'	5' AAC CCT CAG TGC ACG AAG 3'	61°C
IIIa-5'	5' GAT GGC AGA CAT GTT TTG 3'	
IIIa-3'	5' GCT GGA TTC AGA CAC CAC 3'	58°C
IIIb-5'	5' GAG GGT TCA GTG TCA GTG CAG G 3'	
IIIb-3'	5' TCA GAC ACC ACA AAC CAA GAG 3'	55°C
IV-5'	5' GTG GGG TGT TGA AAG ATC	
IV-3'	5' TGG TAT ATA ACC AGT TCA CAG 3'	58°C
V-5'	5' TTC TTG CAC TAA AAA AGG TGA T 3'	
V-3'	5' TGT CAC AGC TGA TGC TGG AT 3'	58°C
VI-5'	5' TTG TGC TTT TGC TAA AAG 3'	
VI-3'	5' ACG ACA CTA TGT CAT CAG 3'	55°C
VII-5'	5' CTT GGC AAT TTA AAT TGC 3'	
VII-3'	5' TTT CAC AGG AAA GTT CAG 3'	61°C
VIII-5'	5' GTG GTA TGA TGA TTA TTC 3'	
VIII-3'	5' AAC TAA AGG TGA TCT TAC 3'	55°C
IXa-5'	5' TGG CAG GCT TTT ATA ATG 3'	
IXa-3'	5' AGG TAC GGA TCC TCT TCC 3'	55°C
IXb-5'	5' GAG CTG TGC AGA GAA GGC 3'	
IXb-3'	5' TGA AGC CAA CCC ACA CAG 3'	61°C

IXc-5'	5' GAT ATA AAG ATC ATG GGC 3'	
IXc-3'	5' TCT CAC CAG CTG GAA GGG 3'	55°C

onte: Vafiadaket *al.* 1998.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 SÍNDROME DE HUNTER NO AMAZONAS

A Figura 23 registra a prevalência (em 2012) de pacientes portadores de Hunter na região norte do Brasil e as distâncias de um voo sem escalas e por via terrestre de Manaus à cidade de Porto Alegre, sede do laboratório de referência. A cidade de São Paulo conta com outro laboratório capacitado para os ensaios enzimáticos e representa o destino alternativo.



Figura 23. Prevalência de MPS II na região norte, em 2012.

Fonte: Arquivo pessoal; Shire Human Genetic Therapies. <http://br.distance.to/Manaus/Porto-Alegre>

De acordo com as estimativas do IBGE/2012, a população da região norte em setembro de 2012 era de 16 318 163 habitantes, distribuída por uma extensa área equivalente a 3.869.637,9 km². O Estado do Amazonas contribuía com 3 590 985 e o Estado do Pará com 7 792 561 habitantes. Manaus abrigava, à época, uma população de 1 832 423 indivíduos.

No estado do Amazonas foram identificados seis pacientes, todos incluídos no estudo. O diagnóstico de MPS II para cinco deles (identificados como P1, P2, P3, P5 e P6) foi fundamentado nas manifestações clínicas, na análise dos heredogramas, nos achados radiológicos e nas dosagens da enzima iduronato sulfatase em leucócitos e plasma (as dosagens de GAGs na urina não foram consideradas). Este grupo reúne os primeiros casos de Hunter descritos na região norte (excetuando Pará), oriundos de quatro famílias amazonenses sem qualquer vínculo familiar. O paciente P4, pertencente à outra família, foi incluído por exibir dados clínicos e radiológicos muito indicativos de MPS II.

O Quadro 05 registra os resultados das dosagens da enzima IDS e dados das histórias clínicas dos pacientes incluídos no estudo.

As fichas clínicas detalhadas dos pacientes, bem como os heredogramas constam do Anexo 5.

Quadro 05. Dosagens da enzima iduronato 2-sulfatase em plasma e leucócitos.

Pacientes	Forma Clínica	Iduronato sulfatase no plasma V.R.: 122 a 463 (nmol/4h/ml)	Iduronato sulfatase em leucócitos V.R.: 31 a 110 (nmoles/h/ mg/prot)
P 1	Atenuada	2,0	7,0
P 2	Grave	3,3 Não detectável	36,0 Não detectável
P 3	Atenuada	6,8	Não detectável
P 4	Grave	125,0	39,0
P 5	Grave	Não detectável	Não detectável
P 6	Grave	Não detectável	Não detectável

VR: valores de referência.

Fonte: Serviço de Genética Médica. Hospital de Clínicas de Porto Alegre (redempsbrasil@ufrgs.br); Fichas clínicas dos pacientes.

(1) Até o fechamento desta tese, foram efetivamente registrados apenas seis pacientes portadores de MPS II no Amazonas.

O Paciente 1 representa o caso pioneiro de MPS (todos os tipos incluídos) registrada na região norte (excluído o Estado do Pará). A suspeita clínica de Síndrome de Hunter deu-se em maio de 2006 no Ambulatório-Escola de Endocrinologia - Fundação Hospital Adriano Jorge, em Manaus, quando o paciente, aos 8 anos de idade, foi atendido para investigação de baixa estatura. Os resultados finais das dosagens enzimáticas confirmando MPS II foram anunciados em junho de 2007. Exibe a forma atenuada da síndrome e quadro clínico menos comprometido entre todos os pacientes estudados.

Os fenótipos considerados graves estiveram associados a níveis indetectáveis da enzima no plasma e leucócitos para os pacientes P4 e P5, não para o Paciente 3. No entanto, níveis enzimáticos de diferentes magnitudes e valor diagnóstico, não definem graus de comprometimento da doença.

Na família do Paciente 2, há o registro de um tio (falecido) com a forma grave. Registrem-se, para o paciente 2, resultados muito diferentes das duas dosagens enzimáticas em leucócitos e plasma, mas com validação diagnóstica.

Os Pacientes 3 e 5 são primos em 1º grau. Nesta família há também o registro de um tio com provável MPS II (falecido). Um primo de 2 anos de idade com traços clínicos suspeitos aguarda os resultados das dosagens enzimáticas. O paciente 5 faleceu em maio 2013, sem ter se beneficiado da terapia enzimática.

Os resultados das dosagens bioquímicas da iduronato-sulfatase em leucócitos e plasma (em exames repetidos) do Paciente 4 mostraram valores reduzidos, mas dentro da faixa de referência, não permitindo o diagnóstico enzimático formal de MPS II.

O Paciente 6 foi desligado do estudo por ter falecido antes do início dos testes de biologia molecular.

(2) Existe demanda reprimida de novos casos de MPS II na região norte do Brasil, notadamente no Amazonas, à espera de diagnóstico.

Alguns indicadores demográficos e sociais são conhecidos, como a população do estado estimada em 3 590 985 habitantes (setembro de 2012), a maioria concentrada na capital (1 832 423 indivíduos), a taxa de natalidade (20,16 pessoas para cada mil habitantes), a taxa de fecundidade (2,4 filhos por mulher) e de mortalidade (15,8 filhos para cada mil habitantes) (IBGE 2009 e 2012). No entanto, o número real de pacientes Hunter é desconhecido e, sequer pode ser calculado pela

inexistência de dados epidemiológicos nacionais e regionais. Considerando que os meninos Hunter sobrevivem sem tratamento enzimático até os 10 - 15 anos (forma grave da MPS II) e podem chegar ao início da idade adulta (forma atenuada da MPS II) igualmente sem tratamento, mesmo descontando aqueles pacientes prematuramente levados a óbito por outras causas, os números efetivos devem ser muito superiores aos seis casos efetivamente diagnosticados. Onde estarão os demais pacientes Hunter, todos sem diagnóstico e sem acesso a um sistema público de saúde de qualidade? Certamente, muitos nas cercanias da capital do estado, alguns nas cidades mais populosas como Parintins e Itacoatiara e poucos dispersos nos grotões dessa imensa região. Depreende-se que um número desconhecido de pacientes vive, sofre e morre sem assistência médica e sem tratamento especializado.

Reconhece-se a raridade da síndrome. No entanto, fica claro que a subnotificação decorre do não-diagnóstico que comprova desconhecimento específico das DDL em especial e das MPSs em particular. Os profissionais da área da saúde ficam sujeitos a erros, seja por relativa desinformação clínica, seja pela falta de conhecimento e de acesso aos métodos específicos de investigação laboratorial. As limitações dos estudantes de Medicina decorrem das reduzidas cargas horárias impostas ao estudo da Genética. Os conteúdos programáticos restritos não incluem os erros inatos do metabolismo.

(3) A precocidade do diagnóstico vai permitir o início precoce da TRE capaz de atenuar sinais e sintomas, evitar o agravamento e as complicações da síndrome.

A TRE do paciente 1 só foi iniciada em 23/07/09, 2 anos após o diagnóstico, ao completar 11 anos de idade. O atraso ocorreu por questões administrativas, logísticas e legais, envolvendo ação judicial. A infusão de idursulfase em regime semanal e sem interrupções, tem garantido grande benefício ao paciente, especialmente, na preservação da capacidade cognitiva e na melhora da amplitude dos movimentos e deambulação. A estatura, praticamente, encontrou o seu limite (1,10 m) com a IO = 15 anos, embora se admita que o crescimento estatural dos meninos cesse com IO = 17-18 anos. Os demais pacientes, igualmente, iniciaram a TRE tardiamente. Sob tratamento continuado apresentaram melhora significativa da amplitude dos movimentos articulares, inclusive da deambulação. Houve nítida melhora dos quadros de infecção respiratória alta muito frequentes no período pré-enzima. A hepatoesplenomegalia regrediu, facilitando a abordagem cirúrgica e

melhorando o prognóstico das hernioplastias umbilicais. Nas formas consideradas atenuadas, o SNC não deu mostras de comprometimento e, infelizmente, nas formas graves, não se registrou modificação dos quadros de déficit cognitivo à observação médica e leiga. Como previsto, as fisionomias grotescas e a disostose óssea não sofreram alteração. A baixa estatura, praticamente, não respondeu à enzima, mesmo nos pacientes com IO atrasada.

O grande desafio para o tratamento precoce é a precocidade do diagnóstico. O tratamento iniciado o mais precocemente possível, com doses adequadas (0,5 mg/kg peso), periodicidade semanal e sem interrupções, pode prevenir ou atenuar a progressão de certas características somáticas da síndrome. Infelizmente, o diagnóstico é tardio. Vieira (2007) desenvolveu um estudo objetivando investigar a trajetória dos pacientes brasileiros com MPS desde o nascimento até o diagnóstico. Foram incluídos 113 pacientes brasileiros oriundos do Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e de outros seis serviços de genética do país, assim distribuídos: MPS I: 18, MPS II: 43, MPS IIIA: 2, MPS IIIB: 3, MPS IIIC: 1, MPS IVA: 15, MPS IVB: 1, MPS VI: 29 e MPS VII: 1), correspondendo a 97 famílias entrevistadas. A mediana de idade do início dos sinais e sintomas foi de 18 meses (MPSI: 18, MPSII: 24, MPS IVA: 8 e MPSVI: 8). Os sinais/sintomas iniciais mais frequentemente relatados foram alterações esqueléticas (MPS IVA e MPS VI), contraturas articulares (MPS II) e face grosseira (MPS I). Desde o início da sintomatologia até o diagnóstico, diferentes profissionais de saúde, incluídos médicos de diferentes especialidades, foram procurados pelas famílias dos pacientes. O diagnóstico, entretanto, foi concluído por um geneticista na quase totalidade dos casos. A mediana da idade ao diagnóstico foi de 76 meses (MPSI: 75, MPSII: 95, MPS IVA: 75 e MPSVI: 52). Houve uma demora de 4,8 anos, em média, entre o início da sintomatologia e a conclusão do diagnóstico. A demora do início do tratamento, condicionado à identificação precisa da síndrome, penaliza os pacientes pelo inevitável agravamento do quadro clínico.

(4) As dosagens enzimáticas notadamente diferentes em um mesmo paciente não são fenômenos isolados.

O paciente 2 realizou dosagens enzimáticas em plasma e leucócitos com resultados muito diferentes, embora com validação diagnóstica. O paciente 3 apresentou níveis muito baixos de IDS no plasma e indetectável em leucócitos. A concomitância de níveis variáveis em um paciente e de níveis baixos e indetectáveis em outro, em ensaios com a mesma metodologia, identifica apenas uma variação

da acuidade dos testes bioquímicos dentro de limites toleráveis? Os testes bioquímicos dosam um *pool* de enzimas com espectro variável de atividade biológica? Revelam expressões gênicas variáveis em momentos biológicos distintos? Sugerem variação circadiana dos níveis enzimáticos? Não existem, até o momento, respostas satisfatórias para essas questões.

(5) O *status* de “padrão ouro” para o diagnóstico não deve permanecer assegurado às dosagens enzimáticas.

Na investigação enzimática dirigida à MPS II, a faixa estabelecida para os valores normais de referência abrange um vasto espectro de resultados (Quadro 5). Valores situados perto dos limites mínimos da normalidade podem gerar dúvidas no estabelecimento do diagnóstico definitivo. Níveis enzimáticos mantidos um pouco acima dos limites mínimos da normalidade garantem a confirmação do diagnóstico? Níveis enzimáticos mantidos um pouco abaixo dos limites mínimos de normalidade excluem o diagnóstico? Qualquer que seja a causa das amplas variações das dosagens enzimáticas em um mesmo paciente, o método deixa de ser plenamente confiável.

O paciente 4 exibe manifestações clínicas e radiológicas sugestivas de MPS II. No entanto, as dosagens enzimáticas aceitas atualmente como “padrão ouro” para o diagnóstico estão dentro da faixa de referência. Por conseguinte, não pode ser classificado como portador de MPS II e não iniciou a TRE específica. Fica claro que o *status* de “padrão ouro” não deve continuar assegurado às dosagens das enzimas. Além do mais, dosagem enzimática não identifica as heterozigotas, inviabilizando o aconselhamento genético para as mulheres sem filhos afetados. O teste bioquímico passaria a representar apenas um bom sinalizador ou rastreador para esse ou aquele tipo de MPS sugerido por critérios clínicos.

(6) O fluxograma atual fundamentado em dosagens enzimáticas, que norteia o diagnóstico e tratamento da MPS II, limita o aconselhamento genético.

As dificuldades para o diagnóstico diferencial das MPSs através de métodos clínicos são reconhecidas e mereceram ampla discussão. A confiabilidade dos métodos bioquímicos, em alguns casos, igualmente pode ser questionada. Apesar disso, discute-se a possibilidade de incluir algumas MPSs em programas de triagem neonatal (Duffner *et al.* 2009; Fuller *et al.* 2011), utilizando a tecnologia de sangue seco em papel filtro para os ensaios enzimáticos (Alves *et al.* 2012). O uso do papel

filtro teria a vantagem de diminuir a enorme dificuldade logística para a remessa de material biológico aos laboratórios de referência situados no extremo sul do país (Figura 23). Entretanto, a inclusão das MPSs em de programas de rastreio do recém-nascido através do “teste do pezinho” não se justifica por serem doenças de rara ocorrência.

A Figura 24 representa o fluxograma usado atualmente na rotina de diagnóstico e tratamento dos pacientes suspeitos de qualquer tipo de MPS. O aconselhamento genético fica dependente da identificação de um caso índice e se restringe ao casal envolvido e sua prole.

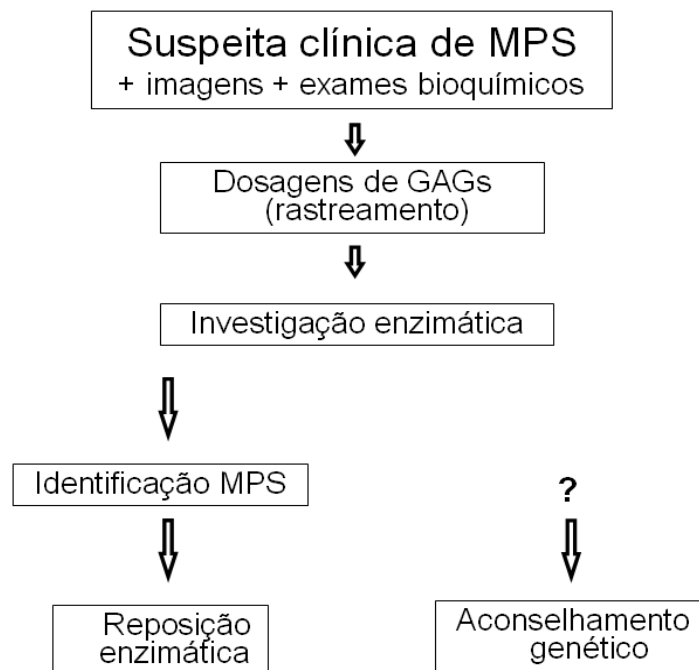


Figura 24. Diagnóstico de MPS e conduta – modelo

Na hipótese de um casal fenotipicamente normal com um filho portador de MPS II (Figura 14), pode-se deduzir que a mãe é portadora da mutação do gene IDS. No dizer de Neufeld e Muenzer (2001), a cada nova gestação, o risco de meninos doentes alcança 50%, mesmo risco de meninas heterozigotas. E quais serão as mulheres portadoras da mutação aptas a gerar filhos doentes?

A Figura 25 exhibe o heredograma da família do paciente (P1). Qual de suas irmãs é heterozigota? Nenhuma, uma, duas ou todas. Em casos como esse, o aconselhamento genético e o planejamento familiar são exercícios puramente teóricos.

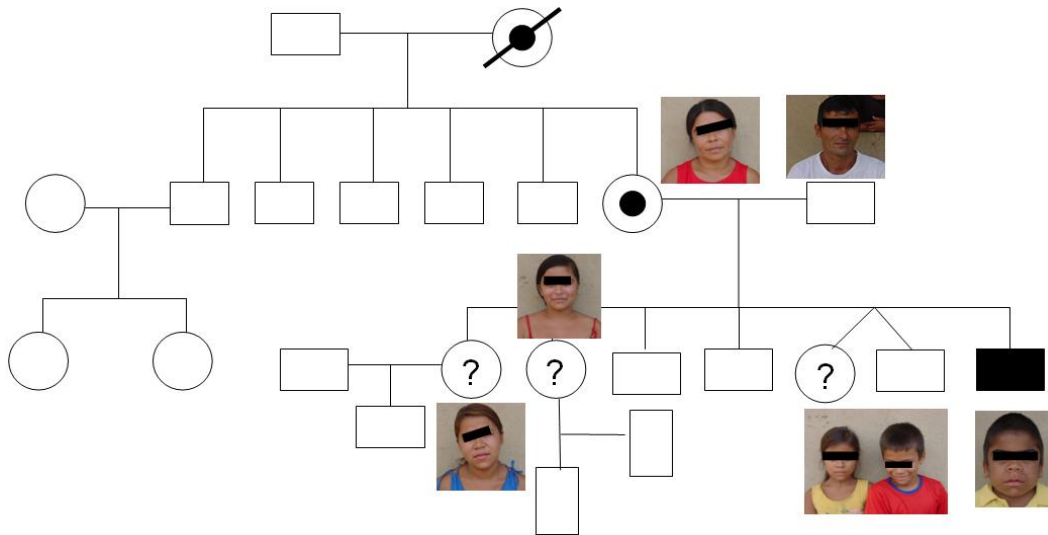


Figura 25. Heredograma da família do Paciente 1.

A demora do diagnóstico agride as famílias dos pacientes em dose dupla. Por um lado, os familiares assistem impotentes à piora clínica dos pacientes e a toda sorte de complicações. Por outro, ficam privados de informações que lhes facultaria o planejamento familiar.

4.2 EXPRESSÃO DO GENE IDS

A Figura 25 mostra o resultado da quantificação da expressão do gene IDS em leucócitos por PCR em tempo real (qPCR) do controle normal e dos pacientes participantes do estudo (P1,2,3,4 e P5).



Expressão
relativa do
gene IDS

Pacientes

Figura 26. Quantificação da expressão do gene IDS.

A quantificação da expressão do gene IDS mutante, representada pelos valores relativos de DNA/cDNA, foi baixa em todos os pacientes em relação aos controles, inclusive no paciente 4 que não teve confirmado o diagnóstico de Hunter pelos critérios enzimáticos.

(7) Os resultados consistentes e significativos da quantificação da expressão genética permitem pressupor a utilidade do método na validação do diagnóstico.

A PCR em Tempo Real (PCR quantitativa ou qPCR) procede a detecção, quantificação e amplificação do DNA em uma única etapa. As vantagens de agilizar os resultados, requerer concentrações de DNA/cDNA mil vezes menores que a PCR convencional e permitir maior reprodutibilidade, sensibilidade e precisão são os destaques.

Maior expressão do gene IDS nos tecidos poderia significar quadro clínico mais leve, enquanto menor expressão indicaria quadro clínico mais severo. No entanto, na série estudada, não foi possível estabelecer correlação entre nível de expressão do gene, nível enzimático e apresentação da doença, exceto para o paciente 2 que exibiu expressão muito baixa, níveis enzimáticos muito baixos ou indetectáveis e a forma grave. Os extremos de expressão, P1 e P5 (Figura 26), são exemplos desses achados conflitantes: P1 exibe a menor expressão, os menores níveis enzimáticos e, surpreendentemente, a forma clínica mais leve, enquanto P5 apresenta a maior expressão, níveis enzimáticos indetectáveis e o quadro clínico mais grave entre todos os pacientes incluídos no estudo.

4.3 SEQUENCIAMENTO DO GENE IDS

Dos pares de *primers* efetivamente empregados correspondentes ao éxon 9, apenas o par IXc-5' (5' GAT ATA AAG ATC ATG GGC 3') e IXc-3' (5' TCT CAC CAG CTG GAA GGG 3') amplificou a região na qual foi identificada uma mutação pontual. Sequenciamento do gene IDS normal comparado com o a sequência (variante 3) depositada no NCBI.

Homo sapiens iduronate 2-sulfatase (IDS), transcript variant 3, mRNA. NCBI Reference Sequence: NM_001166550.1 NM_001166550 5832 bp mRNA linear PRI 17-APR-2013. ACCESSION NM_001166550 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=IDS>).

Alinhamentos

Para os alinhamentos utilizou-se a sequência do genoma humano e o programa BLAST:

(http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=MegaBlast&PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&BLAST_SPEC=blast2seq) contra as sequências dos pacientes e controles.

pacientes parte exon 9
Sequence ID: |c|158059 Length: 300 Number of Matches: 1

Range 1: 1 to 300 [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
549 bits(297)	3e-161	299/300(99%)	0/300(0%)	Plus/Plus
Query 1	CAGAATGTAGTTCATATTTCTCTAAATATGAAAGTATCCAGAAAGGCCAGTGGTAGTAAA	60		
Sbjct 1	CAGAATGTAGTTCATATTTCTCTAAATATGAAAGTATCCAGAAAGGCCAGTGGTAGTAAA	60		
Query 61	AAGCTTAGTGTATATAATCTCAAAGGGATGGAATATTTACAGCTCATATTTATAACATG	120		
Sbjct 61	AAGCTTAGTGTATATAATCTCAAAGGGATGGAATATTTACAACCTCATATTTATAACATG	120		
Query 121	TTGAATCTTCTCAGTTATCAGTAGTCATCAGAAGTGCAATAGCTTTCTAAATAAATATT	180		
Sbjct 121	TTGAATCTTCTCAGTTATCAGTAGTCATCAGAAGTGCAATAGCTTTCTAAATAAATATT	180		
Query 181	AAATATCTACTGTCCTGTAGTGAAGGAGTAATTTTAGTAATTTTCTCTTTACAAAGTCT	240		
Sbjct 181	AAATATCTACTGTCCTGTAGTGAAGGAGTAATTTTAGTAATTTTCTCTTTACAAAGTCT	240		
Query 241	CCAGTGTTCAGGTAAATATTTGTGAAACAAAATACAGCAAACACATTGTTACTTCAG	300		
Sbjct 241	CCAGTGTTCAGGTAAATATTTGTGAAACAAAATACAGCAAACACATTGTTACTTCAG	300		

Figura 27. Alinhamento das sequências dos pacientes com a sequência genômica de indivíduos normais pelo programa BLAST.

Em destaque a mutação pontual de G para A.

Sequência original (base de dados)

AAGCTTAGTGTATATAATCTCAAAGGGATGGAATATTTACAGCTCATATT
TATAACATG

Tradução

KVLSYNLKRDGITAFHIYNM

Sequência com a mutação pontual – posição 2953

AAGCTTAGTGTATATAATCTCAAAGGGATGGAATATTTACAACACTCATATT
TATAACATG

Tradução (a partir da base de dados Expasy)

KVLSYNLKRDGIFTTHIYNM

A análise das mutações no gene IDS permitiu a identificação de uma mutação pontual em todos os pacientes (1, 2, 3, 4 e 5) incluídos no estudo, menos para os controles – uma variante de transcrição do tipo 3 do RNA (NCBI), no início da transcrição do éxon 9, quando comparado com o genoma humano. Os pacientes 3 e 5 são primos em primeiro grau. O paciente 4, embora não tenha o diagnóstico de Hunter confirmado pelas dosagens de IDS em plasma e leucócitos, foi incluído por ser clinicamente suspeito e ter exibido baixa expressão do gene IDS (Figura 26). A mutação pontual (G::A e C::T) pressupõe, em termos teóricos (base de dados Expasy), a presença de resíduos de F (fenilalanina) na cadeia polipeptídica. A troca de resíduos de aminoácidos define, por sua vez, alterações na estrutura primária com possíveis reflexos na conformação secundária e terciária da proteína IDS. O resultado pode ser uma proteína com a conformação modificada, mas que mantém um nível basal de atividade. Justifica níveis enzimáticos normais em pacientes com o fenótipo da doença, inabilitando a dosagem enzimática como método diagnóstico irrefutável.

(8) O achado de mutações pontuais no éxon 9 pode ser interpretado como um fenômeno de grande previsibilidade. No entanto, a mesma mutação em todas as famílias pressupõe parentesco não reconhecido.

O sequenciamento do éxon 9 foi preferido com base na literatura que o qualifica como sede do maior número de mutações nos pacientes Hunter (Macedo *et*

al. 2008; Zhang *et al.* 2011; Zimmer da Silva *et al.* 2011), especialmente em brasileiros, pelo seu maior tamanho em relação aos demais e por incluir códons que apresentam *hotspots*, considerando que a frequência dessas modificações pontuais é diretamente proporcional à intensidade da metilação das citosinas das ilhas CpG. Naturalmente, não estão descartadas outras mutações nos demais éxons (particularmente os éxons 3 e 8), incluindo as pontuais como eventos de transição, caso não sejam corrigidas pelos sistemas de reparo do DNA. Ilhas CpG foram confirmadas em todas as regiões do gene quando a sequência de bases nitrogenadas da isoforma 1 (fita sense com 5876 resíduos) foi submetida ao método descrito por Gardiner-Garden and Frommer (1987). De acordo com esses autores, uma ilha CpG corresponde a um segmento de DNA de 200 bp com um conteúdo de CG maior que 50% e um resultado da divisão do número observado de CpG pelo número esperado de CpG maior que 0,6. (http://www.bioinformatics.org/sms2/cpg_islands.html). Os resultados obtidos, aqui apresentados o maior e o menor valor (ilhas CpG detectadas na região 37 para 236: conteúdo de GC = 74% e observado/esperado = 1,06; ilhas CpG detectadas na região 5319 para 5518: conteúdo de GC = 55,5 % e observado/esperado = 0,60), permitem concluir que existem ilhas CpG em todas as regiões observadas do gene com risco potencial de sofrerem mutações de transição causadoras da síndrome caso não sejam corrigidas pelos sistemas de reparo do DNA. Não podem ser descartadas outras mutações nos demais 8 éxons, incluindo as pontuais como eventos de transição (mutação C::T e G::A).

O achado da mesma mutação pontual nos cinco pacientes das quatro famílias envolvidas no estudo, sem qualquer parentesco conhecido (ressalva para os pacientes P 3 e P5, primos em primeiro grau), é um dado surpreendente. Ao contrário, era esperada a identificação de mutações novas, cada uma particular, por assim dizer, para cada núcleo familiar. Os achados de Rathmann *et al.* (1996) dão força a essa assertiva. Os autores identificaram mutações no gene IDS em um total de 31 famílias / pacientes com MPS II, dos quais 20 são novas e únicas e outra é também nova, mas foi encontrada em três pacientes não aparentados.

Em exercício teórico, considerando a origem étnica dos pacientes - crianças amazonenses com forte influência indígena - os resultados parciais obtidos, poderiam ser aceitos como uma evidência molecular sumaríssima da existência de relações de filogenia intraespécie com o pressuposto de um parentesco não reconhecido (descendência comum).

(9) O início pré-sintomático da TRE, mais efetivo que o tratamento precoce, depende da identificação da mutação nos meninos recém-nascidos filhos de mães heterozigotas.

Os ensaios enzimáticos não se mostram adequados para a identificação das mulheres heterozigotas. Os testes de biologia molecular tornam-se imprescindíveis para a comprovação inequívoca das mutações nas mulheres e em seus filhos recém-nascidos. Essa questão encontra respaldo em trabalhos clássicos. Timms *et al.* (1998) publicaram os resultados de uma pesquisa envolvendo o sequenciamento de produtos de PCR para identificar as mutações em uma portadora obrigatória de mutação no gene IDS. Duas mutações foram observadas dentro de éxon VIII: uma missense (H342Q), na posição de nucleótido 1150 e outra tipo nonsense (G343X), na posição do nucleótido 1151. Outras quatro mulheres da família foram rastreados para a mesma mutação.

Sem os recursos da biologia molecular, as irmãs de um paciente Hunter só terão identidade de heterozigotas quando se revelarem mães de meninos doentes.

Existem evidências crescentes de que o início pré-sintomático da idursulfase, conforme os protocolos estabelecidos, está associado a mudanças favoráveis na história natural da Síndrome de Hunter (também para as MPS I e VI) (Tajima *et al.* 2013). Ao evitar o acúmulo intra-lisossomal de GAGs e garantir a normalidade funcional de células, tecidos e órgãos, previne ou atenua a progressão da maioria dos sintomas viscerais da MPS II. Por conseguinte, o fenótipo da doença não vai se manifestar com os rigores observados nos pacientes tratados tardiamente. No entanto, a melhora das alterações indicativas de disostose múltipla e o prognóstico do desenvolvimento mental parece ser menos promissor nas formas graves da doença (Tajima *et al.* 2013).



Figura 28. Facies de dois irmãos Hunter. Paciente 1 (à esquerda) com 2 anos e 9 meses de idade, antes de iniciar a TRE. Paciente 2 (à direita) com 2 anos e 10 meses após 31 meses de TRE.Fonte: Tajima *et al.* 2013

A Figura 28 apresenta os traços faciais de dois irmãos japoneses com a forma grave de MPS II, causada pela recombinação do gene IDS e pseudogene IDS-2adjacente. Os pacientes iniciaram o tratamento com idursulfase aos 3,0 anos (irmão mais velho) e aos 4 meses de idade (irmão mais novo), e os resultados da TRE foram comparados após 2 anos. No início, o irmão mais velho mostrou características típicas da MPS II, incluindo a deficiência intelectual. Após 34 meses de TRE, sua doença somática ficou estável ou melhorou, mas o declínio cognitivo permaneceu. O irmão mais novo, após 32 meses de TRE, permaneceu livre da maioria das características somáticas que já havia aparecido em seu irmão à mesma idade, manifestando apenas otite média exsudativa. Os exames radiológicos do esqueleto revelaram sinais característicos de disostose múltipla no irmão mais velho no início do tratamento, que não foram alteradas dois anos mais tarde, enquanto o irmão mais novo mostrou apenas leves achados de disostose múltipla em todo o período de tratamento. O quociente de desenvolvimento intelectual do irmão mais novo declinou ao longo do tempo, até um pouco abaixo do normal. Neste caso, os dados colhidos comprovam que o início pré-sintomático da TRE pode prevenir ou atenuar a progressão das características somáticas da MPS II. O *follow-up* de um maior número de pacientes é necessário para confirmar esses benefícios(Tajima *et al.* 2013).

(10) O tratamento enzimático pré-sintomático não deve onerar em demasia os cofres públicos, considerando que a identificação biomolecular das mulheres heterozigotas vai permitir o aconselhamento genético efetivo e favorecer a redução do número de novos casos.

Os custos do tratamento de reposição enzimática são muito elevados devido ao alto preço das enzimas, únicas alternativas terapêuticas reconhecidas, até o momento, para as mucopolissacaridoses I, II, VI e, proximamente, a IV.

Em 22/02/10 o site da revista norte-americana Forbes publicou uma lista dos medicamentos mais caros do mundo, após calcular quanto cada paciente gasta em média por ano (Herper 2010).No topo do *ranking*,está o Soliris (farmacêutica Alexion), destinado ao tratamento de portadores da Hemoglobinúria Paroxística

Noturna (PNH), ao preço de US\$ 409,5 mil em gastos médios anuais. O Elaprase (Shire) vem em segundo lugar, ao preço médio anual de US\$ 375 mil, seguido do Naglazyme (BioMarin), destinado ao tratamento de portadores de MPS VI ou Doença de Maroteaux-Lamy, ao preço de US\$ 365 mil/ano.

A Constituição Federal promulgada em 1988 assegura que todos os cidadãos brasileiros são iguais perante a lei (Art. 5) e que a saúde é direito de todos e dever do Estado (Art. 196). No tocante ao tratamento, os pacientes portadores de doenças raras ou de baixa prevalência são amparados pela Portaria no. 2577/GM/MS, de 27 de outubro de 2006 que aprova o Componente de Medicamentos de Dispensação Excepcional. No entanto, essa legislação não privilegia as doenças de depósito lisossômico, exceto a Doença de Gaucher, beneficiada com normatização específica (Portaria SAS/MS no. 708, de 25 de outubro de 2011 – Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas – Doença de Gaucher). Apesar dos termos da Constituição Federal vigente e da autorização de uso pela ANVISA (2006), a aquisição das enzimas para o tratamento das MPS (particularizando o Elaprase) ainda demanda ação judicial.

Os profissionais de saúde envolvidos no atendimento a esses pacientes estão empenhados em garantir a terapia enzimática de modo continuado, dentro de critérios éticos. As restrições eventuais são impostas por razões médicas. Destaque-se, nesse particular, o consenso claro e honesto sobre as limitações do tratamento enzimático de pacientes portadores da forma grave de MPS II, redigido por renomados especialistas, entre os quais o Prof. Dr. Roberto Giugliani, Chefe do Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (Muenzer *et al.* 2012).

Em nosso país, não foram publicados, até o momento, os custos com os tratamentos das MPS em geral. Tomando como base dados oficiais relativos apenas à importação das enzimas, as cifras impressionam. O Diário Oficial do Poder Executivo do Estado de São Paulo, de 19/10/12, citado como exemplo, publica o processo 001.0001.003.348/2012 referente à ação judicial que determina a aquisição do medicamento importado Idursulfase 2mg/ml – 3ml, com inexigibilidade de licitação e autoriza o repasse de R\$ 6.838.659,19 à empresa Uno Healthcare, Inc., quantia relativa a 1.253 frascos-ampola do produto. Conclui-se que um único frasco de idursulfase (Elaprase 6mg/3mL), alcançou, naquela data, o valor de R\$ 5.457,82, incluídas as despesas operacionais com frete e seguro. Considerando que o tratamento é conduzido a intervalos semanais com doses de 0,5 mg/kg de peso (em bomba de infusão), o custo semanal para um paciente de 25 kg de peso que

utiliza o conteúdo de 2 frascos gira em torno de R\$ 10.915,65 (U\$ 5.200), o que equivale ao valor de, aproximadamente U\$ 270.000 anuais. Somam-se, dentre outras, as despesas com transporte especial (muitas vezes em ambulâncias), alimentação, dia/hospital e salário-dia/acompanhante. Além do mais, o tratamento não se resume à administração da enzima específica. Face ao comprometimento de múltiplos órgãos, aparelhos e sistemas, a abordagem multidisciplinar é requerida. Profissionais de várias especialidades, como otorrinolaringologia, neurocirurgia, ortopedia, cardiologia, anestesiologia, pneumologia, fisioterapia, audiologia e outras, são eventualmente convocados para o atendimento e acompanhamento dos pacientes, gerando novos custos (Muenzer *et al.* 2009). Deve-se atentar para o fato de que as doses semanais de 0,5 mg/kg peso, requeridas por tempo indeterminado, podem ser progressivas, face ao crescimento estatural e aumento de peso dos pacientes, fenômenos observados nos tratamentos mais efetivos.

A busca e identificação dos pacientes portadores de MPSs e dos Hunter, em particular, amplia-se à medida que o conhecimento científico alcança médicos, odontólogos, bioquímicos, fisioterapeutas, enfermeiros, estudantes das áreas de saúde, ou seja, profissionais de saúde em geral que, em algum momento, reconhecem em um indivíduo os traços da doença. O estudo da genética humana, a inclusão do tema nos currículos, a divulgação através de palestras, conferências, simpósios e afins, a divulgação em campanhas veiculadas pela mídia dentro dos princípios éticos, são o caminho para a identificação de casos. Para alguns, o incentivo à busca dos pacientes no confinamento familiar constitui uma estratégia das empresas fabricantes e distribuidoras exclusivas dos medicamentos, visando lucros cada vez maiores. Nessa linha de raciocínio, considerando que o tratamento é assegurado pela Constituição Federal, os gestores públicos seriam obrigados a desviar recursos financeiros de outras áreas para atender à demanda, onerando os cofres públicos. Esse argumento é falho. Os recursos devem estar disponíveis e devem ser aplicados na razão direta de suas necessidades. Os laboratórios atuam dentro das regras impostas pelas agências reguladoras e os lucros são inerentes à atividade comercial. Frequentemente, atendem ao pedido de liberação gratuita do produto, o chamado “uso compassivo”, por tempo não previamente determinado, dentro das regras estabelecidas pela ANVISA, de modo a não adiar o início da TRE. Além disso, investem vultosos recursos em pesquisa de ponta para o desenvolvimento de outras moléculas que se mostrem promissoras.

Utilizando a MPS II como modelo, a identificação clínica de um paciente e o diagnóstico da doença por métodos de biologia molecular, ultrapassando os critérios bioquímicos de alcance limitado, pode somar alguma despesa ao processo. No entanto, a análise molecular, ao identificar as portadoras heterozigóticas da mutação, permite o reconhecimento das potenciais propagadoras da enfermidade. Montado o heredograma, o aconselhamento genético pode ser conduzido com propriedade. O direito individual de uma gravidez de risco fica assegurado por decisão pessoal em contrapartida com a possibilidade real da redução do surgimento de novos casos. O acesso à informação no seio da família vai permitir o diagnóstico e o início da TRE antes da instalação das manifestações clínicas da doença, das comorbidades e complicações. Os pacientes deixarão de ser reféns permanentes de médicos de várias especialidades, de exames custosos e de tratamentos paliativos. Os reflexos na contenção das despesas públicas serão notáveis.

4.4 ANÁLISES DE HRM - *High Resolution Melting*.

A confiabilidade adquirida pela análise HRM no diagnóstico de doenças humanas (Reed *et al.* 2007) de herança autossômica recessiva, dominante e doenças genéticas ligadas ao cromossomo X, aliada à simplicidade, rapidez e custos relativamente menores motivou o emprego do método neste trabalho.

Os resultados da PCR *real time* e análise de fusão de alta resolução (HRM - *High Resolution Melting*), utilizando o aparelho Rotor-Geneda Qiagen Instruments, podem ser apreciados no Anexo 6. Para a MPS II (Hunter), doença recessiva ligada ao cromossoma X, o método oferece amplicons de três diferentes genótipos. Os controles normais (homozigoto para as mulheres e hemizigoto para os homens por conter apenas o alelo no cromossomo X sem correspondente no Y) compõem o tipo selvagem. As mães constituem os heterozigotos (portadoras de um alelo normal e outro mutante). Os pacientes são mutantes. Os Quadros 6, 7, 8 e 9 simplificam os resultados da análise do éxon 9.

Quadro 06. Resultados e Análise do Éxon IX - Região A

No.	Color	Nome	Genótipo	Confiança %
	■	Controle	Selvagem	100,00
	■	Paciente 1	Selvagem	96,67
	■	Paciente 1	Mutante	97,44
	■	Paciente 2	Mutante	97,45
	■	Mãe 2	Heterozigoto	88,74
	■	Paciente 3	Mutante	94,15
	■	Paciente 3	Selvagem	86,75
	■	Mãe 3	Heterozigoto	96,95
	■	Paciente 4	Selvagem	83,50
	■	Paciente 4	Mutante	83,32
	■	Mãe 4	Selvagem	84,89
	■	Mãe 4	Heterozigoto	94,10
	■	Paciente 5	Mutante	92,95
	■	Paciente 5	Selvagem	81,63
	■	Mãe 5	Selvagem	96,82
	■	Mãe 5	Heterozigoto	98,35
	■	Mãe 5	Selvagem	79,77

Quadro 07. Resultados e Análise do Éxon IX - Região B

No.	Color	Nome	Genótipo	% Confiança
	■	Controle	Selvagem	94,77
	■	Paciente 1	Selvagem	99,17
	■	Paciente 2	Selvagem	79,90
	■	Mãe 2	Selvagem	77,11
	■	Mãe 2	Heterozigoto	95,89
	■	Paciente 3	Selvagem	98,75
	■	Paciente 3	Mutante	96,96
	■	Mãe 3	Heterozigoto	99,26

No.	Color	Nome	Genótipo	% Confiança
	■	Paciente 4	Selvagem	90,72
	■	Mãe 4	Heterozigoto	80,62
	■	Paciente 5	Selvagem	89,25
	■	Paciente 5	Mutante	95,09
	■	Mãe 5	Selvagem	79,66

Quadro 08. Resultados e Análise do Éxon VIII

No.	Color	Nome	Genótipo	Confiança %
	■	N	Wild	0,04
	■	N	Wild	0,00
	■	N	Wild	0,00
	■	C	Heterozigoto	0,00
	■	C	Wild	1,45
	■	C	Wild	0,00
	■	C	Heterozigoto	0,00
	■	C	Wild	0,00
	■	C	Wild	7,05
	■	1	Wild	0,00
	■	1	Heterozigoto	0,00
	■	1	Heterozigoto	0,00
	■	2	Wild	15,14
	■	2	Wild	0,00
	■	2	Heterozigoto	0,00
	■	M2	Wild	0,00
	■	M2	Wild	0,31
	■	M2	Wild	0,00
	■	3	Heterozigoto	0,00
	■	3	Heterozigoto	0,00
	■	3	Wild	1,54
	■	M3	Wild	0,00
	■	M3	Heterozigoto	0,00
	■	M3	Wild	0,00
	■	4	Wild	4,63
	■	4	Wild	0,00
	■	4	Heterozigoto	0,00
	■	M4	Heterozigoto	0,00
	■	M4	Wild	5,56
	■	M4	Wild	0,00
	■	5	Wild	0,00

	■	5	Wild	0,00
	■	5	Wild	0,00
	■	M5	Wild	0,00
	■	M5	Hemizigoto	0,00
	■	M5	Wild	0,00

Quadro 09. Resultados e Análise do Éxon IX - Região C

No.	Color	Nome	Genótipo	Confiança %
	■	Controle	Selvagem	100,00
	■	Paciente 1	Selvagem	90,60
	■	Paciente 2	Selvagem	97,55
	■	Mãe 2	Selvagem	95,57
	■	Mãe 2	Selvagem	77,21
	■	Paciente 3	Selvagem	98,95
	■	Mãe 3	Heterozigoto	98,18
	■	Mãe 3	Selvagem	98,92
	■	Paciente 4	Selvagem	97,71
	■	Mãe 4	Heterozigoto	98,92
	■	Paciente 5	Mutante	97,19
	■	Paciente 5	Selvagem	94,82
	■	Mãe 5	Heterozigoto	98,93
	■	Mãe 5	Selvagem	95,17

O éxon IX mereceu destaque para a amplificação através da PCR *real time* e análise de fusão de alta resolução, tal qual ocorreu no processo de sequenciamento do gene, pelas razões discutidas anteriormente. Conforme recomendações do fabricante do Rotor-Gene 2010, devem ser analisados fragmentos de DNA menores que 250 pb. Isto porque uma variação de base única possui um maior efeito no comportamento de fusão de um amplicon de 100 pb do que em um amplicon de 500 pb. Assim sendo, o éxon IX foi amplificado em muitas cópias pela utilização de três pares de primers, permitindo o HRM em separado das três regiões. Para as regiões A, B e C do éxon 9, conforme mostra o Quadro 10, no qual se agrupam pacientes e suas genitoras, as diferenças são evidentes e os três genótipos mostraram presença com elevado grau de confiabilidade (> 83,32%). Ao contrário, para os éxons VIII e III os resultados obtidos não mostraram qualquer diferença entre as amostras, não evidenciando variedade genotípica.

Quadro 10. Genótipos obtidos do éxon IX do gene IDS através do HRM

Éxon IX	Região A (% confiança)	Região B (% confiança)	Região C (% confiança)
Paciente 1 Mãe 1	Mutante (97,44)	Selvagem (99,17)	Selvagem (90,60)
Paciente 2 Mãe 2	Mutante (97,45) Heterozigoto (88,74)	Selvagem (70,90) Heterozigoto (95,89)	Selvagem (97,55) Selvagem (95,57)
Paciente 3 Mãe 3	Mutante (94,15) Heterozigoto (96,95)	Selvagem (98,75) Heterozigoto (99,26)	Selvagem (98,95) Selvagem (98,92)
Paciente 4 Mãe 4	Mutante (83,32) Heterozigoto (94,10)	Selvagem (90,72) Heterozigoto (80,62)	Selvagem (97,71) Heterozigoto (98,92)
Paciente 5 Mãe 5	Mutante (92,95) Heterozigoto (98,35)	Mutante (95,09) Selvagem (79,66)	Mutante (97,19) Heterozigoto (98,93)

Os dados obtidos do HRM da região A do éxon 9 constituem os resultados esperados, considerando que no éxon 9 o sequenciamento permitiu identificar apenas uma mutação, em todos os pacientes. Para as demais regiões, os resultados previstos envolveriam o genótipo selvagem para os pacientes e genitoras. Na região B, tal não ocorreu para M2, M3, M4 e P5. Para a região C houve discrepância apenas com os resultados de M4 e M5. As amostras utilizadas nesta experimentação foram extraídas de leucócitos, usando técnica forense dentro dos critérios estabelecidos nos protocolos e mantidas a -20°C por um período prolongado. No entanto, os resultados conflitantes observados em alguns pontos podem ser decorrentes da imprecisão no modo de coleta, na manipulação e nas condições de armazenagem. As inevitáveis oscilações térmicas decorrentes de frequentes episódios de interrupção do fornecimento de energia, podem ter levado à degradação de algumas cotas de DNA, prejudicando a qualidade exigida para as análises moleculares.

Alguns resultados discordantes entre o genótipo de mães e pacientes em determinada fração do éxon destacado, não invalida o HRM como método capaz de identificar diferentes genótipos do DNA genômico e distinguir as amostras dos heterozigotos, dos mutantes e dos controles selvagens e negativos (Erali *et al.* 2008).

(11) Um novo fluxograma para o diagnóstico seguro da Síndrome de Hunter e aconselhamento genético deve envolver métodos de biologia molecular como o sequenciamento do gene IDS e/ou HRM.

A confirmação da síndrome de Hunter em um caso suspeito, rastreado pela baixa atividade da enzima iduronato-2-sulfatase, deve incluir a análise das mutações no gene IDS através do sequenciamento do cDNA obtido pela RT-PCR, seguido do sequenciamento de amostra do DNA genômico. Identificada a mutação (ou mutações) no gene IDS, o sequenciamento restrito às áreas genômicas afetadas, seria estendido a todos os familiares do sexo feminino para confirmar ou afastar, com segurança, o *status* de mulheres com genótipo heterozigoto.

O HRM constitui outro método capaz de distinguir as amostras do DNA genômico dos heterozigotos, dos mutantes e dos controles.

O fluxograma da Figura 29 representa o novo modelo proposto para o diagnóstico, aplicável a todos os tipos de MPS. Sugere que se abandone a dosagem urinária de GAGs e valoriza a investigação enzimática como método útil para o rastreamento a partir de uma possibilidade clínica bem fundamentada. Introduce os métodos de análise molecular para diagnosticar o tipo de MPS e destaca a análise HRM para identificar, com precisão, as mulheres heterozigotas, de modo a permitir o aconselhamento genético seguro.

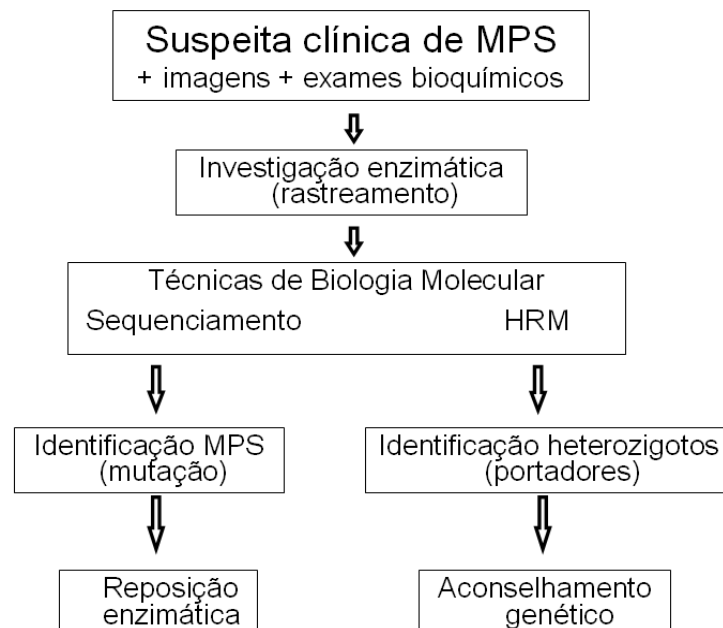


Figura 29. Diagnóstico e conduta – modelo proposto (sequenciamento e HRM).

4.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS DAS DOSAGENS DE Mn^{++} , B_6 e B_{12} .

Quadro 11. Dosagens plasmáticas do Mn^{++} , Vitamina B_6 e Vitamina B_{12} .

Ordem	Grupo	Mn^{++} (0,8 a 3,75 ng/mL)	B_6 (18,7 nmol/L)	B_{12} (397,5 pg/mL)
OC	1	2,7	31,8	341
OC1	1	2,4	27,7	412

P1	3	2,0	14,1	365
1IC	2	2,1	3,2	431
1IS	2	1,1	4,1	318
P2	3	0,9	5,3	232
2M	2	0,8	6,8	367
2T1	2	1,3	11,3	412
2T2	2	2,2	18,5	235
P3	3	2,1	3,2	211
3M	2	1,9	5,3	421
3I	2	2,1	5,9	444
3P	2	2,7	11,2	367
3P1	1	2,8	18,5	381
P4	1	1,0	30,3	332
4M	1	1,2	28,9	132
4A	1	0,7	13,2	239
4T1	1	1,3	14,5	118
4T2	1	1,5	18,6	346
4P1	1	1,7	19,1	276
P5	3	0,9	3,4	288
5M	2	0,5	1,3	365
5I	2	0,6	2,6	110

Constituição dos grupos

- 1- controle (padrões normais)- inclui o paciente P4, cujas dosagens enzimáticas não confirmaram MPS II, e seus familiares;
- 2- familiares de pacientes - inclui sus genitoras;
- 3- pacientes - P1, P2, P3 e P5.

Níveis séricos normais de referência: para o Mn 0,8 a 3,75 ng/mL (média de 1,8 ng/mL) (Barceloux 1999); para as vitaminas B₆ e B₁₂ os valores das concentrações séricas de B₆ e B₁₂ foram de 18,7 (DP 5,1) nmol/L e 397,5 (DP 188,4) pg/mL, respectivamente (Steluti *et al.* 2011).

Os dados pormenorizados das análises estatísticas dos resultados das dosagens de Mn⁺⁺ e vitaminas B₆ e B₁₂ constam do Anexo 07. Os resultados apurados das dosagens plasmáticas do Mn⁺⁺, vitamina B₆ e vitamina B₁₂ receberam

análises estatísticas através da ANOVA (análise de variância) para comparação dos grupos e Teste de Tukey para comparação múltipla.

1. Manganês (Mn⁺⁺)

Análise descritiva - as médias foram semelhantes, com ligeira variação para o grupo 01; os desvios - padrão estão muito próximos.

Grupo	Média	Desvio -padrão
1	1,700	0,762
2	1,530	0,767
3	1,475	0,665

ANOVA – Foi realizada análise de variância e não foi detectada diferença estatisticamente significativa para as médias de dosagens do Mn⁺⁺ (p-valor = 0,840) entre os grupos.

2. Vitamina B₆

Análise descritiva – a média para o grupo controle foi muito maior que a média dos grupos de pacientes e de seus familiares; os desvios-padrão dos grupos de pacientes e familiares foram semelhantes e o desvio-padrão do grupo de controles foi um pouco maior.

Grupo	Média	Desvio-padrão
1	22,51	7,15
2	7,02	5,24
3	6,5	5,15

ANOVA – Foi detectada diferença significativa entre os grupos (p-valor <0,0001)

Teste de Tukey – foi detectada diferença significativa entre o grupo 1 e os grupos 2 (p-valor = 0,0001) e 3 (p-valor = 0,0008), entretanto não houve diferença significativa entre os grupos 2 e 3 (p-valor = 0,9885).

Análise diagnóstica

Na análise diagnóstica, tanto para o Mn⁺⁺ quanto para a B₆ não foi detectado desvio de normalidade e nem de estabilidade de variância.

Vitamina B₁₂

3.

Análise descritiva – as médias são semelhantes, embora o grupo 3 apresente uma média e desvio-padrão menor em relação aos outros grupos.

Grupo	Média	Desvio-padrão			
1	286,3	104,8			
2	347,0	103,7	3	274,0	68,8

ANOVA – Não foi detectada diferença significativa entre os grupos (p-valor 0,321).

Análise de resíduos

Tanto para o Mn^{++} quanto para a B_6 e B_{12} não foi detectado desvio da normalidade e nem de estabilidade de variância.

Análise do Mn^{++}

Nenhum paciente exibiu valores inferiores ao mínimo normal. Nível baixo se mostrou em apenas dois familiares e em um controle. Na análise estatística, as médias das dosagens foram semelhantes, com ligeira variação para o grupo 1 (grupo controle). Os desvios – padrão ficaram muito próximos. Realizada a análise de variância (ANOVA), não foi detectada diferença estatisticamente significativa para as médias de dosagens do Mn^{++} (p-valor = 0,840) entre os grupos. Neste estudo, portanto, a deficiência do cofator enzimático da enzima IDS, acreditando ser o Mn^{++} , não ficou comprovada.

Os pacientes admitidos neste estudo, todos oriundos de famílias de baixo nível socioeconômico, não tem acesso rotineiro aos alimentos ricos em Mn^{++} . A provável deficiência alimentar de Mn^{++} , fazia supor que os resultados das dosagens séricas do cátion confirmasse níveis baixos para o grupo de pacientes e, por analogia, para o grupo de familiares, quando comparados aos resultados do estudo de referência. Tal não ocorreu. A possível explicação para esses achados reside no fato de que os humanos dispõem de mecanismos homeostáticos de controle nos processos de absorção e excreção muito eficientes (World Health Organization. Manganese. Geneva, 1981), capazes de manter os níveis plasmáticos do Mn^{++} dentro de uma estreita faixa de variação (Manganese Health Research Program (MHRP): <http://www.manganese-health.org/>), além do que o manganês atravessa a

barreira placentária e supre as necessidades do conceito, embora os fetos não acumulem o metal (Eum *et al.* 2011; <http://www.manganese-health.org/>).

Análise da B₆

Baixas concentrações de piridoxina foram encontradas no plasma dos pacientes quando comparadas aos valores de referência, confirmando categoricamente, a hipovitaminose B₆. Mesmo comportamento foi exibido por todos os familiares. Os resultados do grupo controle estiveram acima do valor de referência. Os resultados das amostras 14, 17, 18 e 19 estiveram dentro da média – 1 DP. Na análise estatística, a média para o grupo 1 (controle) foi muito maior que a média dos grupos de pacientes (grupo 3) e de seus familiares (grupo 2). Foi detectada diferença estatisticamente significativa (p -valor < 0,0001) entre os grupos e também diferença estatisticamente significativa entre o grupo controle e os grupos de familiares (p -valor = 0,0001) e de pacientes (p -valor = 0,0008). Entretanto, não houve diferença estatisticamente significativa (p -valor = 0,9885) entre os grupos de familiares e de pacientes (Teste de Tukey).

Análise da B₁₂

Todos os pacientes mostraram resultados de cobalamina um pouco abaixo do valor de referência. Igual comportamento foi exibido pelos familiares. No entanto, o grupo controle mostrou dois resultados surpreendentes baixos em comparação ao valor de referência, embora dentro da média – 1 DP. Na análise estatística, as médias dos resultados da cobalamina são semelhantes entre os grupos controle e pacientes, embora o grupo de pacientes apresente uma média e desvio-padrão menores em relação aos outros grupos. No entanto, não foi detectada diferença estatisticamente significativa (p -valor 0,321) entre os grupos (ANOVA).

A hipovitaminose B₁₂ não é tão comum na população jovem pela propriedade de ser armazenada nos músculos e fígado (Higdon 2009; Reynolds 2012; <http://lpi.oregonstate.edu/infocenter/vitamins/vitaminB12/>), exceto para indivíduos que adotam baixa dieta protéica ou consumidores estritos de dieta vegetariana.

(12) Expressões fenotípicas diferentes em pacientes com a mesma mutação sugerem a interferência decisiva de fenômenos epigenéticos modificadores do genótipo.

Algumas questões envolvendo a relação genótipo-fenótipo ainda suscitam dúvidas. Em muitos casos, não é possível determinar se uma certa mutação irá causar um quadro atenuado ou grave de MPS II e nem explicar os fenótipos que se estendem de um extremo clínico ao outro. Nas famílias com mais de um indivíduo doente, presume-se que a mutação comum defina quadros clínicos similares. No entanto, tem-se observado casos de pacientes com parentesco próximo e o mesmo genótipo que exibem fenótipos francamente distintos. Yatziv *et al* (1977) publicaram dois casos de MPS II em irmãos, sendo que um apresentava o fenótipo grave enquanto o outro tinha um fenótipo atenuado. Considerando que irmãos doentes podem mostrar cursos clínicos completamente diferentes (Yatziv *et al.* 1977), os autores concluíram que, além da ação primária do gene IDS modificado, é altamente provável a participação de outros genes na regulação da expressão do gene IDS e de fatores ambientais capazes de modificar os seus efeitos e interferir no fenótipo. Nas palavras de Zlotogora *et al.* (1986), as variações clínicas eventualmente observadas nessas circunstâncias podem ser decorrentes de fatores não relacionados ao genótipo (Zlotogora *et al.* 1986). Outros autores reafirmaram que o mesmo genótipo em parentes com as formas grave e atenuada da doença comprova a contribuição de outros modificadores genéticos ou ambientais no fenótipo (Lualdi *et al.* 2006, Froissart *et al.* 2007).

Dentre os fatores ambientais que podem modular a expressão do gene IDSh e interferir no fenótipo, este estudo destacou a influência de fatores nutricionais representados pelo piridoxal (piridoxina), a vitamina B₁₂ ou cobalamina, coenzimas essenciais na metilação do DNA. O estudo incluiu o Mn⁺⁺ devido a ação do cátion como provável cofator da enzima IDSh (Pedroza 2011). As hipóteses envolvendo as vitaminas B₆ e B₁₂ com a metilação do gene IDS poderiam representar um novo enfoque para explicar os diferentes fenótipos em doentes Hunter cujo parentesco pressupõe a mesma mutação pontual.

Os pacientes 3 e 5, primos em primeiro grau, com a mesma mutação presumível e identificada no éxon 9 do gene IDS, mostravam quadros clínicos flagrantemente diferentes (Figura 30). O paciente 5, exibindo a forma grave e de maior intensidade entre todos, não se beneficiou da TRE por decisão familiar e veio a óbito recentemente aos 13 anos de idade. Destaque para o extremo grau de pobreza da família do paciente (mãe, o paciente e duas irmãs menores de idade), vivendo na cidade de Boa Vista – RR, sem endereço fixo e sem fonte de renda.

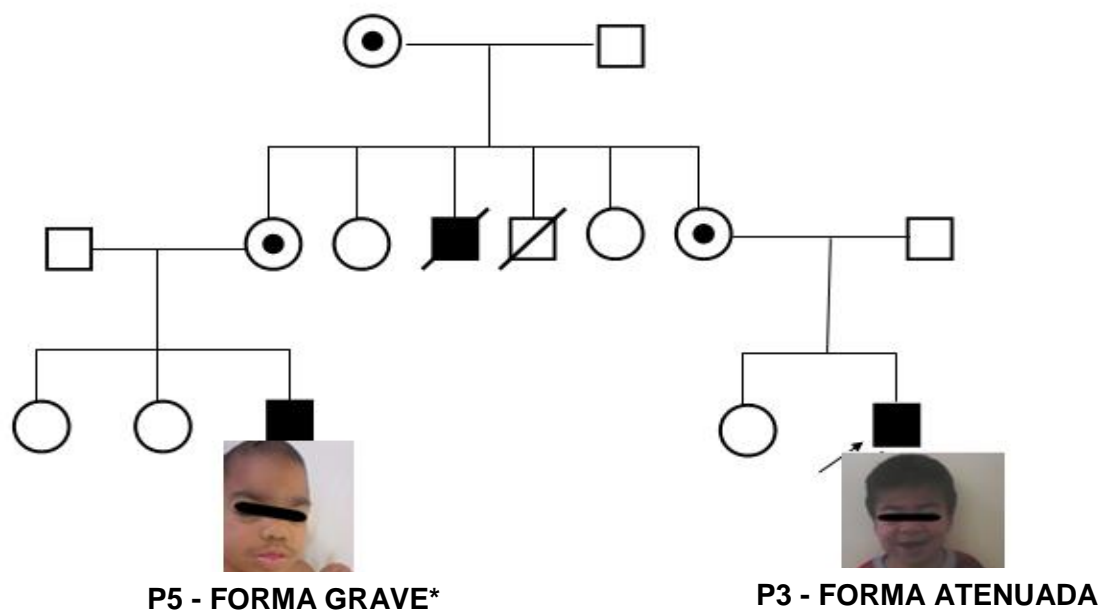


Figura 30. Mesmo genótipo, fenótipos diferentes.

Fonte: Cabral 2012 (arquivo pessoal). (* Paciente faleceu em maio deste ano).

Os pacientes P1 e P3 exibem a forma atenuada da síndrome, embora apresentem níveis muito baixos (e indetectáveis) da enzima em plasma e leucócitos. Para Schwartz (2004) pacientes com níveis enzimáticos extremamente reduzidos podem apresentar fenótipos mais leves, o que sugere que outros fatores genéticos ou epigenéticos possam interferir no fenótipo (Schwartz *et al.* 2004).

(13) As hipovitaminoses B₆ e B₁₂ confirmadas em pacientes Hunter interferem no padrão de metilação, mas não explicam a hipermetilação observada na maioria desses pacientes.

As vitaminas do complexo B (B₆, B₁₂ e B₉) atuam como cofatores para enzimas envolvidas no metabolismo da metionina e da homocisteína. Nos indivíduos saudáveis, o padrão de metilação caracterizado por hipermetilação de 80% dos dinucleotídeos CpG dispersos no genoma (fora do promotor) e hipometilação das ilhas CpG nas regiões promotoras do gene IDS (Jaenisch e Bird 2003), estaria garantido pelos níveis normais de homocisteína relacionados à não deficiência alimentar de vitaminas do complexo B. Este quadro manteria a expressão normal do gene IDS (Esteller *et al.* 2002; Blackledge *et al.* 2010; Thomson *et al.* 2010) e ausência da doença. Tomatsu *et al.* (2004), quando compararam os padrões de metilação de genes IDS de controles normais e de pacientes com doença de Hunter, verificaram que os pacientes Hunter, em sua maioria, tinham uma percentagem de

metilação mais alta nas regiões promotoras do gene IDS. Os sítios específicos de CpG em áreas de éxons com uma mutação de transição eram mais metilados em pacientes Hunter, enquanto os sítios CpG em éxons de controles normais estavam hipometilados. A hiperhomocisteinemia, resultado da deficiência de piridoxina e de cobalamina (Figura 15), promove *status* de hipometilação, uma vez que o acúmulo deSAH em determinada concentração pode inibir as reações biológicas de metilação de DNA (Tchantchou *et al.* 2008;Werder 2010). Em outras palavras, as hipovitaminoses B₆ e B₁₂, associadas ou não, podem estar relacionadas à hipometilação do DNA (Finkelstein 2007; Werder 2010). Nos pacientes Hunter deste estudo, as dosagens de piridoxina e cobalamina comprovaram, inequivocamente, quadros de hipovitaminoses B₆ e B₁₂. A hiperhomocisteinemia decorrente, relacionada à hipometilação, contraria o *status* de metilação aumentada descrito na literatura para a maioria dos pacientes Hunter.

Como explicar este aparente paradoxo?

Vários fatos científicos podem ser relacionados. 1. Nem todos os pacientes Hunter são hipermetilados. 2. Ao contrário do genoma que é idêntico nos diferentes tipos celulares, o epigenoma é dinâmico e varia de uma célula para outra (D'Alessio e Szyf 2006). 3. Além da metilação, outros mecanismos epigenéticos como as modificações das histonas e a presença de RNAs não codificadores estão envolvidos no processo transcricional (Tang e Ho 2007). 4. Existe a probabilidade da ação de outros genes na regulação da expressão do IDS mutante, além de outros fatores capazes de interferir no fenótipo (Yatziv *et al.* 1977). As hipovitaminoses B₆ e B₁₂ poderiam induzir, via hiperhomocisteinemia, hipometilação dos dinucleotídeos CpG dispersos no genoma, mas não impediriam o aumento de metilação nas ilhotas CpG em sítios específicos. Ao interferirem no padrão de metilação em determinados genes, poderiam inibir genes ativadores ou ativar genes inibidores da transcrição e expressão do IDS e definir a doença. Este fenômeno é bem conhecido em genética oncológica. A hipermetilação em regiões promotoras de genes supressores de tumor e a hipometilação de regiões promotoras de proto-oncogenes (Rodenhiser e Mann 2006) estão implicadas na gênese de várias formas de câncer (McKusick 2007; Antunes 2008; Pavarino 2012). A desregulação no processo de metilação pode mudar a conformação da cromatina e permitir a transcrição de genes que agem na carcinogênese (Moura 2013).

Outra questão envolve os elevados gradientes de concentração de homocisteína nas células. Este estado poderia derivar a metabolização da homocisteína para a via de remetilação, favorecer a síntese de metionina e da S-adenosilmetionina e permitir a metilação progressiva e cumulativa do DNA.

(14) As hipovitaminoses B₆ e B₁₂, na presença de hiperhomocisteinemia, podem estar relacionadas aos quadros neurológicos e psiquiátricos observados nos quadros demenciais das formas graves do Hunter.

O aumento dos níveis de homocisteína em decorrência de níveis baixos de ácido fólico, vitamina B₆ e vitamina B₁₂, têm sido correlacionados com a piora do desempenho em testes cognitivos (Wang *et al.* 2001; Wardlaw e Kessel 2002). Werder (2010) demonstrou que a hipovitaminose B₁₂ está associada a distúrbios psiquiátricos e neurológicos (quadros demenciais) de pacientes portadores de várias doenças neuro-degenerativas na presença de hiperhomocisteinemia. O comprometimento cognitivo leve ou a demência leve a moderada, observados em alguns pacientes da clínica neurológica e psiquiátrica, pode mostrar algum grau de melhora com tratamento suplementar de B₁₂ (Werder 2010). A suplementação de vitaminas do complexo B (vitamina B₉, vitamina B₆ e vitamina B₁₂) constitui uma terapia eficiente e segura na redução da homocisteína em 30% - 50%, com reflexos na diminuição da morbidade e mortalidade cardiovascular (Cook e Hess 2005).

A administração de vitamina B₆, em diferentes condições fisiopatológicas e experimentais, oferece proteção contra o estresse oxidativo ao impedir a geração de radicais livres reativos de oxigênio (*reactive oxygen species* ou ROS) (Kannan e Jain 2004). São assinalados benefícios na redução de complicações diabéticas, na melhora do envelhecimento cognitivo, bem como na prevenção da doença cardíaca coronariana.

A administração de complexo B tem sido proposta na tentativa de prevenir, diminuir a taxa de progressão ou reverter as alterações neurológicas associadas a várias doenças neurodegenerativas em humanos, tais como a doença de Alzheimer. Os dados ainda não fornecem evidências de um efeito adequado. No entanto, mesmo benefícios modestos podem ter efeitos significativos sobre a qualidade de vida de pacientes, redução da sobrecarga do cuidador e diminuição dos custos econômicos para a sociedade (Balk *et al.* 2007).

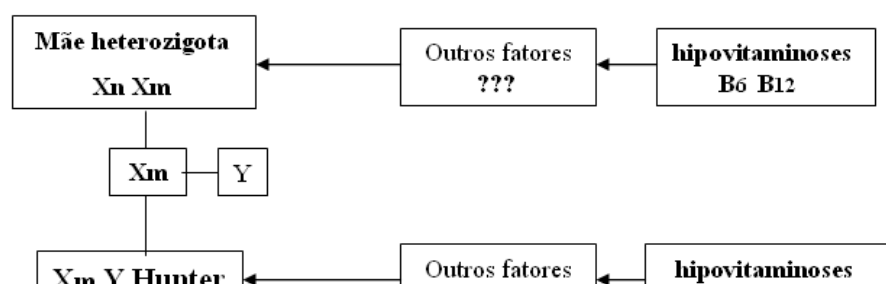
Todos esses dados, ancorados em vigorosa argumentação científica, encorajam o uso clínico dessas vitaminas na prevenção e no controle sintomático de outras condições mórbidas nas quais a hiperhomocisteinemia encontra destaque fisiopatológico.

Os resultados das dosagens de piridoxina e cobalamina nos pacientes do estudo mostraram-se reduzidos, mas não viabilizaram uma correlação clara entre as hipovitaminoses e os quadros demenciais encontrados nos pacientes portadores da forma grave da MPS II (pacientes P2, P4 e P5). Abre, entretanto, perspectivas para o uso terapêutico da cobalamina nesses pacientes.

(15) A correção dos quadros de hipovitaminoses B₆ e B₁₂ em mulheres heterozigóticas (X_nX_m) em processo de gestação de conceptos do sexo masculino portadores da mutação (X_m Y) poderia auxiliar no restabelecimento da normalidade das vias metabólicas da homocisteína/metionina, melhorando a transcrição e expressão do gene IDS mutante.

O presente estudo comprovou hipovitaminoses B₆ nos pacientes Hunter e B₁₂ em alguns, quadros relacionados à hiperhomocisteinemia e hipometilação. Estes resultados não confirmam dados de literatura que registram metilação aumentada para a maioria dos pacientes portadores de Síndrome de Hunter, conforme já foi discutido. Sejam quais forem os outros fatores através dos quais fica garantida a metilação aumentada nos pacientes Hunter, sobrepondo-se à hipometilação, as hipovitaminoses B₆ e B₁₂ estariam envolvidas, de alguma forma, através de mecanismos fisiopatológicos a serem esclarecidos. O aumento da ocorrência de metilação variável no gene IDS mutante abre a possibilidade de mutações transacionais nesses sítios, podendo comprometer ainda mais a expressão do gene considerado. Este fenômeno ajudaria a explicar a grande variabilidade fenotípica que distingue as formas atenuadas das formas graves da doença e a impossibilidade de correlacionar o genótipo com o fenótipo.

A Figura 31 representa o fluxograma do modelo proposto para explicar a possível interferência das hipovitaminoses B₆ e B₁₂ nos mecanismos de metilação do gene IDS, expressão gênica e fenótipo dos pacientes Hunter.



m = mutante, n= normal

Figura 31. Interferência das hipovitaminoses B₆ e B₁₂ em pacientes Hunter.

A carência alimentar é presumível e justificaria a desnutrição como causa da hipovitaminose B. As anamneses conduzidas com as genitoras dos pacientes de nossa casuística confirmaram que as quatro famílias não aparentadas são de baixa renda e não têm acesso diário aos produtos alimentares ricos em vitaminas do complexo B, muitos de custo elevado.

Mulheres heterozigotas ($X_n X_m$) com carência nutricional, em processo de gestação de conceptos do sexo masculino ($X_m Y$), podem transmitir ao concepto as mutações transacionais que não forem corrigidas pelos mecanismos de reparo do DNA. A deficiência vitamínica pode ser continuada nos filhos expostos às mesmas condições alimentares. À mutação herdada, que já compromete por si a expressão do gene IDS, somam-se outras alterações pontuais que agravam ainda mais a expressão do gene, definindo níveis variáveis de produção da enzima IDS e fenótipos de amplo espectro. Por conta disso, deve ser assegurado às gestantes e à prole, suplementação alimentar de vitamina B₆ e B₁₂ buscando corrigir os quadros de hipovitaminoses. Esta medida, visando diminuir a sintomatologia clínica de doenças genético-metabólicas encontra precedente no uso da vitamina B₉ (ácido fólico) para a profilaxia de defeitos do tubo neural dos conceptos. O fechamento do tubo neural ocorre nas primeiras quatro semanas após a concepção. Quando esse fechamento não se completa, instala-se a anencefalia e a espinha bífida, os defeitos mais frequentes do SNC (Lima *et al.* 2002). A suplementação com ácido fólico, iniciada

entre um e três meses antes da concepção e mantida até o final do primeiro trimestre de gestação, leva à redução de incidência das malformações do tubo neural (Ray *et al.* 2004; Cook e Hess 2005).

(16) A suplementação de vitaminas do complexo B ao paciente, terapia coadjuvante de baixo custo, poderia aumentar a eficácia da reposição enzimática, de modo a permitir o uso de doses menores de enzima.

A resposta ao tratamento com Elaprase - Idursulfase (frascos de 6 mg/3 ml de solução a 2 mg/ml) com doses semanais intravenosas de 0,5 mg/kg de peso é satisfatória quando a TRE é iniciada precocemente. Qualquer medida terapêutica coadjuvante capaz de potencializar a ação enzimática com segurança, mantendo a mesma eficácia, poderá permitir o emprego de doses menores. Reduzir doses significa reduzir custos. Nos pacientes sob idursulfase, a maior eficácia da enzima, com possibilidade de queda das doses requeridas, poderia ser demonstrada caso os pacientes fizessem uso concomitante de vitaminas B₆ e B₁₂, reduzidas nos portadores de MPS II, na hipótese de favorecer a expressão do gene IDS mutante. Estudos experimentais bem desenhados, conduzidos em animais IDS deficientes, podem abrir caminho para a validação do uso em humanos.

(17) Existem perspectivas terapêuticas visando a regressão do comprometimento do SNC.

O comprometimento do SNC não regride nas formas graves, uma vez que as enzimas recombinantes não são capazes de atravessar a barreira hematoencefálica. Estão sendo conduzidos estudos de administração direta da enzima no cérebro, através de injeções intratecais, para superar o déficit cognitivo da MPS II (também para MPS IIIA e MPS I) (Dickson e Chen 2011; Alves *et al.* 2012).

Outras formas de terapia estão sendo testadas para os portadores de MPS com envolvimento do SNC, com destaque para a genisteína (fitoestrogênio pertencente à classe das isoflavonas) que se mostra capaz de regular para melhor a expressão de vários genes que codificam enzimas das MPSs, estimular a biogênese dos lisossomos e inibir a síntese e o acúmulo de GAGs (Wegrzyn 2013).

Estudos experimentais *in vitro* comprovam que o produto é capaz de inibir a síntese e o acúmulo de GAGs em fibroblastos de pacientes com várias formas de MPS, nomeadamente os tipos I, II, IIIA, IIIB. Em modelos animais (camundongos)

com MPS IIIB, o produto além de inibir a síntese e o acúmulo de GAGsem fibroblastos, promove depuração em fibroblastos e em células cerebrais, com modificação dos testes comportamentais.

Até o momento, não se tem resultados de estudos clínicos conduzidos em humanos (Piotrowska *et al.* 2006; Friso *et al.* 2010), exceto um único estudo publicado por Jakóbkiewicz-Banecka *et al.*(2007). A genisteína foi usada por via oral em crianças com a Síndrome de Sanfilippo (formas A e B). Após um ano de tratamento, houve melhora estatisticamente significativa em todos os parâmetros cognitivos testados (Alves *et al.* 2012).

As vitaminas do complexo B podem se mostrar promissoras, uma vez que atravessam a barreira hemato-encefálica, permitindo a correção das hipovitaminoses B nas células do SNC de origem conjuntiva, favorecendo a expressão do gene IDS.

(18) A hipoglicemia poderia ser um risco ao uso de doses inapropriadamente elevadas de idursulfase.

A enzima lisossomal IDS foi detectada em vários tecidos, incluindo o pâncreas (Flomen *et al.* 1993; Malmgren *et al.* 1995). Os resultados dos trabalhos desenvolvidos por Piquer *et al.* (2009) sugerem que a superexpressão de IDS h aumenta a liberação de insulina induzida pela glicose. O aumento da secreção de insulina não decorre do aumento na síntese deste hormônio hipoglicemiante e sim, do estímulo das fases finais dos processos de exocitose. Pelo exposto, pode-se deduzir que a administração da enzima em doses superiores às necessidades do paciente, em determinado momento biológico, pode induzir à hipoglicemia na dependência do estado nutricional deste paciente. O uso de doses menores de enzima e a adição de glicose ao soro fisiológico, veículo de administração endovenosa de idursulfase recomendado pelos trabalhos de referência (Giugliani *et al.* 2010; Schwartz *et al.* 2011), poderia reduzir esse risco.

5. CONCLUSÕES

Esse trabalho é um estudo de casos de pacientes portadores de síndrome de Hunter nascidos e criados no Amazonas, oriundos de famílias não aparentadas (exceto para os pacientes 3 e 5) de forte etnia indígena, que exibem fenótipos dispersos da forma atenuada à grave. O estudo procurou responder, com argumentos clínicos, bioquímicos, genéticos e moleculares, todos os tópicos apresentados nos objetivos, utilizando procedimentos em biotecnologia de doenças hereditárias não triviais em nosso meio. Os achados permitiram apresentar questões que podem ser úteis para a rediscussão de aspectos relevantes da doença. O sequenciamento do gene IDS definiu em todos uma mesma mutação pontual, pressupondo uma ancestralidade comum. O achado de mutação pontual no gene IDS do paciente 4, com fenótipo sugestivo de Hunter e baixa atividade enzimática em dosagens repetidas no plasma e leucócitos, mas dentro dos valores normais de referência, contribuiu para consolidar a proposta de um novo fluxograma, visando o diagnóstico. Para os casos clinicamente suspeitos ficariam dispensadas as dosagens bioquímicas de GAGs na urina devido a não especificidade dos resultados. Os ensaios enzimáticos, pelo conflito de resultados em alguns casos, perderiam o *status gold standard* e passariam à condição de métodos de rastreamento de casos prováveis, estabelecidos por critérios clínicos. O diagnóstico preciso da MPS II seria realizado pelo sequenciamento do gene IDS em amostras de sangue, mormente para os pacientes nos quais as dosagens da enzima se mantivessem nos valores mínimos da normalidade. O sequenciamento do gene IDS

dos casos-índice facilitaria a identificação dos heterozigotos e permitiria o aconselhamento genético para as mulheres sem prole ou com prole e sem filhos doentes. A RT - PCR e análise de fusão de alta resolução (HRM - High Resolution Melting), constitui outro método apropriado para diferenciar as amostras do DNA genômico de heterozigotos, mutantes, controles selvagens e negativos com as vantagens da rapidez e do baixo custo. Face ao valor elevadíssimo do tratamento de reposição enzimática com o Elaprase, fica evidente o alcance da adoção de uma política médico-social de aconselhamento das famílias que carregam o peso de uma doença genética metabólica grave. A associação genótipo/fenótipo não pode ser estabelecida, sugerindo a possível interferência de outros condicionantes genéticos e ambientais no genótipo e/ou na expressão do gene. Destaque para os fatores ambientais representados por nutrientes, em especial a piridoxina e a cobalamina, cujas dosagens plasmáticas se mostraram reduzidas em todos os pacientes Hunter. Esses quadros de hipovitaminoses que se associam à elevação da homocisteína e a fenômenos de hipometilação do gene contrariam os achados de metilação elevada na maioria dos pacientes Hunter, conforme descrito na literatura. No entanto, esses resultados não invalidam a suplementação de vitaminas do complexo B às genitoras e aos pacientes expostos a uma crônica deficiência alimentar, na tentativa de corrigir as hipovitaminoses e modificar a expressão do gene e a atividade enzimática, com possíveis reflexos no fenótipo. Para o paciente em si e familiares, torna-se primordial buscar melhores resultados para o tratamento enzimático. A vitaminoterapia a custo reduzidíssimo, abre a possibilidade de obter maior eficácia da TRE, inclusive com chance de auxiliar na redução do déficit cognitivo dos portadores da forma neurológica da doença. Novos estudos são exigidos para o entendimento aprofundado dessas questões, sobretudo dos fatores garantidores do *status* de hipermetilação do gene que abre caminho para a inativação transcricional. Torna-se obrigatória a adoção de protocolos consentidos em grupos com número mais expressivo de pacientes, que privilegiem estudos comparativos sobre parâmetros clínicos dos resultados da TRE com e sem suplementação vitamínico-mineral. O incentivo ao desenvolvimento de um laboratório de biologia molecular no Estado do Amazonas e a definição de protocolos mais rápidos e de custos menores iria permitir o diagnóstico seguro das MPSs e de outras doenças genéticas humanas, dispensando a logística dispendiosa requerida para o envio de amostras de material biológico a outros centros de pesquisa.

6. REFERÊNCIAS (*)

1. Adachi N, Lieber MR. Bidirectional gene organization: a common architectural feature of the human genome. *Cell* 2002; 109:807-809.
2. Allen LH. How common is vitamin B-12 deficiency? *Am J Clin Nutr*. 2009;89(2):693S-696S.
3. Alexander AL, Nishi MY, Funari MFA, Souza SC, Arnhold IJP, Mendonça BB. Short stature caused by SHOX gene haploinsufficiency: from diagnosis to treatment. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2008 July;52(5):765-773.
4. Alves S, Mangas M, Prata MJ, Ribeiro G, Lopes L, Ribeiro H, Pinto-Basto J, Lima MR, Lacerda L. Molecular characterization of Portuguese patients with mucopolysaccharidosis type II shows evidence that the IDS gene is prone to splicing mutations. *J Inherit Metab Dis*. 2006 Dec;29(6):743-54.
5. Alves SC, Lacerda MF. Glycosaminoglycan Storage Disorders: A Review. *Biochemistry Research International*. 2012Jan;2012:1-16. DOI:10.1155/2012/471325.
6. Anawis MA. Hunter syndrome (MPS II-B): a report of bilateral vitreous floaters and maculopathy. *Ophthalmic Genet*. 2006; 27(2): 71-2.
7. Anjos AR, Silva MA, Borelli P. Matriz Extracelular e Leucemia. Revisão. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2000; 22(3): 404-412.

8. Antunes LMG. Interação gene-dieta-quimioterápico sobre as alterações epigenéticas do DNA e instabilidade cromossômica [Dissertação]. Ribeirão Preto: Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP). Universidade de São Paulo (USP). 2008.
9. Applegart DA, Toone JR, Lowry RB. Incidence of Inborn Errors of Metabolism in British Columbia. *Pediatrics*. 2000; 105:109-205.
10. Armandola E. Conference report-epigenetics-sound, silence, and the notes in between. Highlights of the European Society of Human Genetics Annual Meeting; 2004 June 12-15; Munich, Germany. *Med Gen Med*.2004;6(3):63.
11. Attwood JT, Yung RL, Richardson BC. DNA methylation and the regulation of gene transcription. *Cell. Mol. Life Sci*. 2002. 59: 241-252
12. Bach G, Eisenberg FJr, Cantz M, Neufeld EF. The defect in the Hunter syndrome: deficiency of sulfiduronate sulfatase. *Proc Nat Acad Sci*.1973; 70: 2134-2138.PubMed; PMID 4269173.
13. Baehner F, Schmiedeskamp C, Krummenauer F, Miebach E, Bajbouj M, Whybra C, Kohlschutter A, Kampmann C, Beck M. Cumulative incidence rates of the mucopolysaccharidoses in Germany. *J Inherit Metab Dis*. 2005; 28:1011-7.
14. Balk E M, Raman G, Tatsioni A, Chung M, Lau J, Rosenberg IH, MD. Vitamin B6, B12, and Folic Acid Supplementation and Cognitive Function. A Systematic Review of Randomized Trials. *Arch Intern Med*. 2007; 167(1):21-30.
15. Barceloux DG. Manganese. *Clin Toxicol*. 1999 Jan; 37(2):293-307.
16. Baylin SB, HermanJG, Graff JR, Vertino PM, Issa JP. Alterations in DNA methylation: a fundamental aspect of neoplasia. *Adv Cancer Res*.1998; 72:141-196.
17. Beck M. Mucopolysaccharidosis Type II (Hunter Syndrome): clinical picture and treatment. *Curr Pharm Biotechnol*. 2011Jun; 12(6):861-6. Doi: 1389-2010/11.
18. Ben-simon-schiff E, Zlotogora J, Abeliovich D, Zeigler M, Bach G. Hunter syndrome among Jews in Israel. *Biomedicine & Pharmacotherapy*.1994; 48:381-384.

19. Bentley D et al. The DNA sequence of the human X chromosome. *Nature*. 2005 March 17; 434:325-337.
20. Beutler E. Gaucher's disease. *N Engl J Med*. 1991; 325(19):1354-1360.
21. Bird AP. CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature* 1986 May 15-21; 321(6067): 209-213. PubMed; PMID 2423876.
22. Blackledge N, Zhou J, Tolstorukov M, Farcas A, Park P, Klose R. CpG islands recruit a histone H3 lysine 36 demethylase. *Mol Cell*. 2010; 38:179-90.
23. Blackledge N, Klose R. CpG island chromatin: a platform for gene regulation. *Epigenetics*. 2011; 6:147-52.
24. Blasko I, Stampfer-Kountchev M, Robatscher P, Veerhuis R, Eikelenboom P, Grubeck-Loebenstein B. How chronic inflammation can affect the brain and support the development of Alzheimer's disease in old age: the role of microglia and astrocytes. *Aging Cell*. 2004; 3(4):169-176.
25. Bohr MV, Lydeking-Olesen E, Moller J, Nexø E. A daily intake of approximately 6 µg vitamin B-12 appears to saturate all the vitamin B-12-related variables in Danish postmenopausal women. *Am J Clin Nutr*. 2006; 83:52-58.
26. Bolster MWG. Glossary of Terms Used in Bioinorganic Chemistry: Prosthetic groups. International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) Recommendations. *Pure & Appl. Chem*. 1997; 69(6):1251-1303.
27. Bond CS, Clements PR, Ashby SJ, Collyer CA, Harrop SJ, Hopwood JJ, Guss JM. Structure of a human lysosomal sulfatase. *Structure*. 1997; 5:277-289.
28. Bondeson ML, Dahl N, Malmgren H, Kleijer WJ, Tonnesen T, et al. Inversion of the IDS gene resulting from recombination with IDS-related sequences is a common cause of the Hunter syndrome. *Hum Mol Genet*. 1995; 4:615-621.

29. Bondeson ML, Malmgren H, Dahl N, Carlberg BM, Petterson U. The presence of an IDS-related locus (IDS2) in Xq28 complicates the mutational analysis of Hunter syndrome. *Eur J Hum Genet.* 1995; 3:219-227.
30. Bottema CD, Ketterling RP, Vielhaber E et al. The pattern of spontaneous germline mutation: relative rates of mutation at or near CpG dinucleotides in the factor IX gene. *Hum Genet.* 1993;91:496-503.
31. Brusius Facchin A C. Análise molecular de pacientes com Mucopolissacaridose tipo II [Dissertação]. Porto Alegre, RS. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Medicina. 2012.
32. Buchino JJ, Vogler CA. Anatomical pathology of lysosomal storage diseases. In: Applegarth DA, Dimmick JE. *Organelle Diseases: Clinical Features, Diagnosis, Pathogenesis and Management.* London: Chapman & Hall, 1998.
33. Bunge S, Steglich C, Beck M, Rosenkranz W, Schwinger E, Hopwood JJ, Gal A. Mutation analysis of the iduronate-2-sulfatase gene in patients with mucopolysaccharidosis type II (Hunter syndrome). *Hum Molec Genet.* 1992; 1:335-339.
34. Burruss DM, Wood TC, Espinoza L, Dwivedi A, Holden KR. Severe Hunter syndrome (mucopolysaccharidosis II) phenotype secondary to large deletion in the X chromosome encompassing IDS, FMR1, and AFF2 (FMR2). *J Child Neurol.* 2012 Jun;27(6):786-90.
35. Camargo Pinto LL. Avaliação de manifestações clínicas e laboratoriais em heterozigotas para mucopolissacaridose tipo II [Tese]. Porto Alegre, RS. Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). 2009.
36. Camargo Pinto LL, Maluf SW, Leistner-Segal S, Zimmer da Silva C, Brusius-Facchin A, Graef Burin M, Brustolin S, Llerena J, Moraes L, Vedolin L, Schuch A, Giugliani R, Schwartz IVD. Are MPS II heterozygotes actually asymptomatic? A study based on clinical and biochemical data, X-inactivation analysis and imaging

evaluations. *American Journal of Medical Genetics Part A*. 2011 January; 155(1):50-5

37. Carrel L, Willard HF. X-inactivation profile reveals extensive variability in X-linked gene expression in females. *Nature*. 2005 March 17; 434:400-404.

38. Clarke JTR, Wilson PJ, Morris CP, Hopwood JJ, Richards RI, Sutherland GR, et al. Reply to Migeon. *Am J Hum Genet*. 1993; 53(2):433-34.

39. Clarke WL, Greer PM, Strasberg RD, Pearce MA, Skomorowski PM. Hunter disease (mucopolysaccharidosis type II) associated with unbalanced inactivation of X chromosomes in a karyotypically normal girl. *Am J Genet*. 1991; 49:289-297.

40. Clayton PT. B6-responsive disorders: A model of vitamin dependency. *J Inher Metab Dis*. 2006; 29:317-326.

41. Cook S, Hess OM. Homocysteine and B vitamins. *Handb Exp Pharmacol*. 2005; 170:325-338.

42. Cooper DN, Youssoufian H: The CpG dinucleotide and human genetic disease. *Hum Genet*. 1988; 78:151-155.

43. Cooper DN, Krawczak M. Mechanisms of Insertional Mutagenesis in Human Genes Causing Genetic Disease. *Human Genetics*. 1991; 87:409-415.

44. Coronado-Pons I, Novials A, Casas S, Clark A, Gomis R. Identification of iduronate-2-sulfatase in mouse pancreatic islets. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2004; 287:E983-E990.

45. Cox TM, Schofield JP. Gaucher's disease: clinical features and natural history. *Baillieres Clin Haematol*. 1997; 10(4):657-689.

46. Csoka AB, Frost GI, Stern R. The six hyaluronidase-like genes in the human and mouse genomes. *Matrix Biology*. 2001; 20(8):499-508.

47. Cudry S, Tigaud I, Froissart R, Bonnet V, Maire I, Bozon D. MPS II in females: molecular basis of two different cases. *J Med Genet.*2000; 37(10):29-32.
48. D'Alessio AC, Szyf M. Epigenetic tête-à-tête: the bilateral relationship between chromatin modifications and DNA methylation. *Biochem Cell Biol.*2006; 84:463-76.
49. Davis SR, Quinlivan EP, Shelnut KP, et al. Homocysteine synthesis is elevated but total remethylation is unchanged by the methylenetetrahydrofolate reductase 677C -->T polymorphism and by dietary folate restriction in young women. *J Nutr.*2005; 135(5):1045-1050. PubMed; PMID 15867279.
50. D' Cruz LG, Baboonian C, Phillimore H E, Taylor R, Elliott PM, Varnava A, Davison F, Mckenna WJ, Carter ND. Cytosine methylation confers instability on the cardiac troponin T gene in hypertrophic cardiomyopathy. *J Med Genet.*2000; 37:9-18.
51. De Duve C, Pressman BC, Gianetto R, Wattiaux R, Appelmanns F. Tissue fractionation studies. 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue. *Biochem J.*1955; 60:604-617.
52. Deminice R, Vilhena R, Portari GV, Jordão AA. Creatine supplementation, homocysteine and oxidative stress. *Revista Medicina Ribeirão Preto.* 2007;40 (3):368-77.
53. Dias Correia JHR, Dias Correia AA. Some functional properties of epigenome, genome and transcriptome in animals. *Red Vet.*2007; 7(10):1300-477.
54. Dickson PI, Chen AH. Intrathecal enzyme replacement therapy for mucopolysaccharidosis I: translating success in animal models to patients. *Current Pharmaceutical Biotechnology.* 2011;12(6):946-955.
55. Dieter T. Estudo molecular e confirmação do aspecto patogênico de mutações novas em pacientes brasileiros com a Síndrome de Morquio A. [Dissertação]. Porto Alegre, RS. Universidade Federal d rio Grande do Sul (UFRS). 2006.

56. DiFerrante NM, Nichols BL Jr. A case of the Hunter syndrome with progeny. *Johns Hopkins Med J.* 1972; 130:325-328. PubMed; PMID 4622960.
57. Di Ferrante NM. N-acetylglucosamine-6-sulfate sulfatase deficiency reconsidered. *Science.* 1980; 210(4):448-468.
58. Doherty GJ, McMahon HT. Mechanisms of endocytosis. *Annu Rev Biochem.* 2009; 78:857-902.
59. Drew RD, Muskin PR. Vitamin deficiencies and mental health: How are they linked? *Current Psychiatry.* 2013 January; 2 (01) páginas.
60. Duffner PK, Caggana M, Orsini JJ, et al. Newborn screening for Krabbe disease: the New York state model. *Pediatric Neurology.* 2009; 40(4):245-252.
61. Eloranta TO, Kajander EO, Raina AM. A new method for the assay of tissue. S-adenosylhomocysteine and S-adenosylmethione. Effect of pyridoxine deficiency on the metabolism of S-adenosylhomocysteine, S-adenosylmethionine and polyamines in rat liver. *Biochem J.* 1976; 160(2):287-294.
62. Erali M, Voelkerding KV, Wittwer CT. High resolution melting applications for clinical laboratory medicine. *Experimental and Molecular Pathology.* 2008; 85: 50-58.
63. Erali M, Wittwer CT. High Resolution Melting Analysis for Gene Scanning. *Methods.* 2010 April; 50(4):250-261.
64. Esko JD, Zhang L. Influence of core protein sequence on glycosaminoglycan assembly. *Curr Opin Struct Biol.* 1996; 6:663-670.
65. Esko JD, Kimata K, Lindahl U. Proteoglycans and Sulfated Glycosaminoglycans. In: Varki A, et al. *Essentials of glycobiology 1a.* ed. New York. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2009. p.229-248.
66. Esteller M, et al. Cancer as an epigenetic disease: DNA methylation and chromatin alterations in human tumors. *J Pathol.* 2002; 196:1-7.

67. Eum J, Cheong H, Ha E, et al. Maternal Manganese Exposure and Infant Birth Weight. *Epidemiology*.2011;22(1):S70.
68. Filippon L. I Investigação de parâmetros de estresse oxidativo em pacientes com mucopolissacaridose tipo II. O efeito da terapia de reposição enzimática. (Tese de Mestrado). Rio Grande do Sul. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Instituto de Ciências Básicas da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica. 2011. (<http://hdl.handle.net/10183/28826>)
69. Ferreira TG. Biossíntese de Glicoaminoglicanos Sulfatados: Novos Enfoques para o Estudo de Atividades e Interações de Enzimas do Golgi. (Dissertação). São Paulo. Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP). 2011.
70. Filocamo M, Cooper DN, Di Rocco M. Mucopolysaccharide Storage Disorders. Published Online: 2011Jan17. 261-272. DOI: 10.1002/9780470015902.a0006095.
71. Finkelstein JD. Metabolic regulatory properties of S-adenosylmethionine and S-adenosylhomocysteine. *Clin Chem Lab Med*. 2007; 45(12):1694-9.
72. Flomen RH, Green PM, Bentley DR, Giannelli F, Green EP. Detection of point mutations and a gross deletion in six Hunter syndrome patients. *Genomics*.1992; 13: 543-550.
73. Flomen RH, Green EP, Green PM, Bentley DR, Giannelli F. Determination of the organisation of coding sequences within the iduronate sulphate sulphatase (IDS) gene. *Hum Mol Genet*. 1993January;2:5-10.
74. Frank AA. Participação do Ácido Fólico, Vitamina B6 e B12 na Prevenção de Enfermidades Associadas ao Envelhecimento. In: Frank AA, Soares EA. *Nutrição no envelhecer*. São Paulo: Atheneu, 2002. p.129-142.
75. Frank AA. Vitaminas Hidrossolúveis: Tiamina, Riboflavina e Niacina. In: Frank AA, Soares EA. *Nutrição no envelhecer*. São Paulo: Atheneu, 2002. p.163-169.

76. Freije D, Helms C, Watson MS, Donis-Keller H. Identification of a second pseudoautosomal region near the Xq and Yq telomeres. *Science*.1992; 258: 1784–1787.
77. Friso A, Tomanin R, Salvalaio M, Scarpa M. Genistein reduces glycosaminoglycan levels in a mouse model of mucopolysaccharidosis type II. *Br J Pharmacol*.2010; 159:1082-91. Doi: 10.1111/j.1476-5381.2009.00565.x.
78. Froissart R, Maire I, Millat G, Cudry S, Birot AM, Bonnet V, Bouton O, Bozon D. Identification of iduronate sulfatase gene alterations in 70 unrelated Hunter patients. *Clin Genet*.1998; 53:362-368. PubMed; PMID 9660053.
79. Froissart R, Moreira da Silva I, Guffon N, Bozon D, Maire I. Mucopolysaccharidosis type II–genotype/phenotype aspects. *Acta Paediatr Suppl*. 2002; 91:82-87.
80. Froissart R, Moreira da Silva I, Maire I. Mucopolysaccharidosis type II: an update on mutation spectrum. *Acta Paediatr*.2007;96:71-7.
81. Fuller M, Tucker JN, Lang DL, et al. Screening patients referred to a metabolic clinic for lysosomal storage disorders. *J Med Genet*.2011Mar17; 48(6):422-5. Doi: 10.1136/jmg.2010.088096.
82. Fuso A, Cavallaro RA, Zampelli A, et al. gamma-Secretase is differentially modulated by alterations of homocysteine cycle in neuroblastoma and glioblastoma cells. *J Alzheimers Dis*.2007; 11(3):275–290.
83. Futerman AH, van Meer G. The cell biology of lysosomal storage disorders. *Nat Rev Mol Cell Biol*.2004; 5:554-565.
84. Galdieri L C. Níveis de Homocisteína Plasmática e Polimorfismos Associados aos seu Metabolismo em Crianças Portadoras de Defeitos Cardíacos Congênitos. (Dissertação). Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina. 2004. www.unifesp.br/centros/creim/niveisdehomocisteina.html.

85. Galperin MY, Bairoch A, Koonin EV. A superfamily of metalloenzymes unifies phosphopentomutase and cofactor-independent phosphoglycerate mutase with alkaline phosphatases and sulfatases. *Protein Sci.* 2008Dec31; 7(8):1829-1835.
86. Garcia A, Zanibbi K. Homocysteine and cognitive function in elderly people. *CMAJ.*2004Oct12; 171(8):897-904.PubMed; PMID 15477631.Doi: 10.1503/cmaj.1031586
87. Gardiner-Garden M, Frommer M. CpG islands in vertebrate genomes. *J Mol Biol.* 1987; 196(2):261-282. PubMed; PMID 3656447.
88. Gerber GB, Leonard A, Hantson PH. Carcinogenicity, mutagenicity and teratogenicity of manganese compounds. *Crit Ver In Oncol Hematol.*2002; 42:25-34.
89. Ginsburg LC, DiFerrante DT, Caskey CT, DiFerrante NM. Glucosamine-6-SO₄sulfatase deficiency: a new mucopolysaccharidosis. *Clinical Research*,1077; 25:471-473.
90. Ginsburg LC, Donnelly PV, DiFerrante DT. N-acetylglucosamine-6-sulfate sulfatase in man: deficiency of the enzyme in a new mucopolysaccharidosis. *Pediatric Research.*1978;12(7):805-809.
91. Giugliani R, Vieira T, Schwartz I, Munhoz V, Pinto L, Steiner C, Ribeiro M, Boy R, Ferraz V, Kim C, Acosta A. Mucopolysaccharidoses in Brazil: What Happens From Birth to Biochemical Diagnosis? *American Journal of Medical Genetics. Part A* 2008;146A:1741-1747.
92. Giugliani R, Vieira T, Cabral JM, Santos ES, Correa Neto J, Martins AM, et al. Mucopolysaccharidosis I, II, and VI: Brief review and guidelines for treatment. *Genetics and Molecular Biology. Review Article.*2010;33 (4):589-604.
93. Giugliani R, Cabral JM, Federhen A, Rojas MVM, et al. Terapia de reposição enzimática para mucopolissacaridoses I, II e VI: Recomendações de um grupo de especialistas brasileiros. *Rev Assoc Med Bras.*2010;56(3):257-77.

94. Giugliani R, Carvalho CG, Herber S, Camargo Pinto LL. Recent advances in treatment approaches of mucopolysaccharidosis VI. *Current Pharmaceutical Biotechnology*.2011;12(6):956-962.
95. Gort L, Chabas A, Coll MJ. Hunter disease in the Spanish population: molecular analysis in 31 families. *J Inherit Metab Dis*.1998;21: 655-661. PubMed, PMID 9762601.
96. Greilberger J, Koidl C, Greilberger M, et al. Malondialdehyde, carbonyl proteins and albumin-disulphide as useful oxidative markers in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Free Radic Res*. 2008;42(7):633-638.
97. Guo YB, Pan HD, Guo CM, Li YM, Chen LM. Identification of a Novel Mutation of IDS Gene from a Chinese Pedigree with MPS II. *Yi Chuan*. 2009Nov; 31(11):1101-6.
98. Hammond C, Braakman I, Helenius A. Role of N-linked oligosaccharide recognition, glucose trimming, and calnexin in glycoprotein folding and quality control. *Proc Natl Acad Sci USA*.1994;91:913-917.
99. Henthorn PS, Raducha M, Fedde KN, Lafferty MA, Whyte MP. Different missense mutations at the tissue-nonspecific alkaline phosphatase gene locus in autosomal recessively inherited forms of mild and severe hypophosphatasia. *Proc Natl Acad Sci USA*.1992; 89:9924-9928.
100. Higdon J, Drake VJ. Vitamin B12. Rare sensory and autonomic disturbances associated with vitamin B12 deficiency. *J Neurol Sci*.2009;287(1-2):285-7.
101. Hopwood JJ, Bunge S, Morris CP, Wilson PJ, Steglich C, Beck M, Schwinger E, Gal A. Molecular basis of mucopolysaccharidosis type II: mutations in the iduronate-2-sulphatase gene. *Hum Mutat*.1993;2:435-442. PubMed; PMID 8111411.
102. Hopwood JJ, Brooks DA. An introduction to the basic science and biology of the lysosome and storage diseases. In: Applegarth DA, Dimmick JE, Hall JG. *Organelle Diseases*. New York. Chapman and Hall, 1997. p.7-35.

103. Hunter C. A rare disease in two brothers. *Proc Soc Med.* 1917;10:104-106. PubMed; PMID 19979883.
104. Hurley L. Teratogenic aspectos of manganese, zinc and copper nutrition. *Rev Physiol.*1981;61:249-95.
105. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística: Estimativa de 2011 do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) de 26 de setembro de 2012.
106. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Síntese dos Indicadores Sociais 2010. Arquivado do original em 09 de março de 2013. Página visitada em 13 de abril de 2013.
107. Institute of Medicine. Vitamin B₁₂ In: Dietary Reference Intakes for Thiamin, Riboflavin, Niacin, Vitamin B₆, Folate, Vitamin B₁₂, Pantothenic Acid, Biotin, and Choline. Washington, DC: Institute of Medicine, National Academy Press, pp306–356, 1998.
108. Illingworth R, Bird A. CpG islands– a rough guide. *FEBS Lett*, 2009;583:1713-20.
109. Jakóbkiewicz-Banecka J, Wegrzyn A, Wegrzyn G. Substrate deprivation therapy: a new hope for patients suffering from neuronopathic forms of inherited lysosomal storage diseases. *Journal of Applied Genetics.*2007;48(4):383–388.
110. Jaenisch R, Bird A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nature Genetics.*2003;33, 245-254.
111. Janvier K, Bonifacino JS. Role of the endocytic machinery in the sorting of lysosome-associated membrane proteins. *Mol Biol Cell.*2005;16:4231-42.
112. Jennings JJ, Zhu JH, Rbaibi Y, Luo X, Chu CT, Kiselyov K. Mitochondrial aberrations in mucopolipidosis type IV. *J Biol Chem.*2006;281:39041-39050.
113. Jones MZ, Alroy J, Rutledge JC, Taylor JW, Alvord EC, Toone J, Applegarth D, H

- opwood JJ, Skutelsky E, Ianelli C, Thorley-Lawson D, Mitchell Herpolsheimer C, Arias A, Sharp P, Evans W, Sillence D, Cavanagh KT. Human mucopolysaccharidosis IIID: clinical, biochemical, morphological and immunohistochemical characteristics. *J Neuropathol Exp Neurol.*1997; 56:1158-1167.
114. Kannan K, Jain SK. Effect of vitamin B6 on oxygen radicals, mitochondrial membrane potential, and lipid peroxidation in H₂O₂-treated U937 monocytes. *Free Radical Biology & Medicine.*2004;36(4):423-428.
115. Keen C, Lonnerdal B, Hurley LS. Manganese in Biochemistry of the essential ultratrace elements. New York: Plenum Publishing Co; 1984.
116. Keeratichamroen S, Cairns JR, Wattanasirichaigoon D, Wasant P, Ngiswara L, Suwannarat P, Pangkanon S, Kuptanon J, Tanpaiboon P, Rugirawat T, Liammongkolkul S, Svasti J. Molecular analysis of the Iduronate-2-sulfatase gene in Thai patients with Hunter Syndrome. *J Inherit Metab Dis.*2008Dec31; Suppl 2:S303-1
117. Keulemans JL, Sinigerska I, Garritsen VH, Huijmans JG, et al. Prenatal diagnosis of the Hunter syndrome and the introduction of a new fluorimetric enzyme assay. *PrenatDiag.*2002;22(11):1016-21.
118. Kim CH, Hwang HZ, Song SM, Paik KH, Kwon EK, Moon KB, Yoon JH, Han CK, Jin DK. Mutational spectrum of the iduronate 2 sulfatase gene in 25 unrelated Korean Hunter syndrome patients: identification of 13 novel mutations. *Hum Mutat.*2003;21:449-450.
119. Kiselyov K, Jennigs JJ, Rbaibi Y, Chu CT. Autophagy, mitochondria and cell death in lysosomal storage diseases. *Autophagy.*2007;3:259-262.
120. Krypuy M, Newnham GM, Thomas DM, Conron M, Dobrovic A. High resolution melting analysis for the rapid and sensitive detection of mutations in clinical samples: KRAS codon 12 and 13 mutations in non-small cell lung cancer. *BMC Cancer.*2006;6:295-299.

121. Li P, Bellows AB, Thompson JN. Molecular basis of iduronate-2-sulphatase gene mutations in patients with mucopolysaccharidosis type II (Hunter syndrome). *J Med Genet.*1999;36:21-7.PubMed; PMID 9950361.
122. Li XY, Shi XY, Ju J, Hu XH, Yang XF, Zou LP. A novel iduronate 2-sulfatase mutation in a Chinese family with mucopolysaccharidosis type II. *World J Pediatr.*2012;8(3):281-283.
123. Lin SP, Chang JH, Lee-Chen GJ, Lin DS, Lin HY, Chuang CK. 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.*2006;369(1):29-34.
124. Lima Bueno RB. Alterações epigenéticas do gene p16 em ratos tratados com altas doses de L metionina. [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo; 2009.
125. Lombardini JB, Talalay P. Formation, functions and regulatory importance of S-adenosyl-L-methionine.*Advances in Enzyme Regulation.*1971;9:349-384.
126. Lu JZ, Hui EK, Boado RJ, Pardridge WM. Genetic engineering of a bifunctional IgG fusion protein with iduronate-2-sulfatase.*Bioconjug Chem.*2010Jan;21(1)151-6. Doi: 10.1021/bc900382q.
127. Lualdi S, Di Rocco M, Corsolini F, Spada M, Bembi B, Cotugno G, Battini R, Stroppiano M, Pittis MG, Filocamo M. Identification of nine new IDS alleles in mucopolysaccharidosis II. Quantitative evaluation by real-time RT-PCR of mRNAs sensitive to nonsense-mediated and nonstop decay mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease.*2006April;1762(4):478-484.
128. Lualdi S, Tappino B, Di Duca M, Dardis A, Anderson CJ, Biassoni R, Thompson PW, Corsolini F, Di Rocco M, Bembi B, Regis S, Cooper DN, Filocamo M. Enigmatic In Vivo Iduronate-2-Sulfatase (IDS) Mutant Transcript Correction to Wild-Type in Hunter Syndrome. *Human Mutation. Mutation in Brief.*2010; 31:E1261-E1285.

129. Lukatela G, Krauss N, Theis K, Selmer T, Gieselmann V, Saenger W. Crystal structure of human arylsulfatase A: The aldehyde function and the metal ion at the active site suggest a novel mechanism for sulfate ester hydrolysis. *Biochemistry*.1998;37:3654-3664.
130. Lyon MF. Gene action in the X-chromosome of the mouse (*Mus musculus*). *Nature*.1961;190:372-373.
131. Lima HT, Saunders C, Ramalho A. Ingestão dietética de folato em gestantes do Município do Rio de Janeiro. *Rev Bras Saúde Matern Infant*. 2002;2:303-11.
132. Macedo B C, Silva C Z, Brusius A C, Leistner-Segal S, Giugliani R, Schwartz I V. Caracterização do espectro de mutações do gene IDS presentes em pacientes com Mucopolissacaridose tipo II registrados na Rede MPS Brasil. In: XVI Encontro de Geneticistas do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, de 27 a 29 de julho de 2008.
133. Maihara VA, Silva MG, Baldini VLS, Miguel AMR, Favaro DIT. Avaliação nutricional de dietas de trabalhadores em relação a proteínas, lipídios, carboidratos, fibras alimentares e vitaminas. *Cienc Tecnol Aliment*.2006;26(3):672-677.
134. Malmgren H, Carlberg BM, Pettersson U, Bondeson ML. Identification of an alternative transcript from the human iduronate-2-sulfatase (IDS) gene. *Genomics*.1995;29:291-293.
135. Mankin HJ, Trahan CA, Barnett NA, Laughead J, Bove CM, Pastores GM. A questionnaire study for 128 patients with Gaucher disease. *Clinical Genetics*. 2006March; 69(3):209-217.
136. Margraf RL, Mao R, Highsmith WE, Holtegaard LM, Wittwer CT.. Mutationscanning of the RET protooncogene using high-resolution melting analysis. *Clin.Chem*.2006;52:138–141.
137. Martin DC, Atmuri V, Hemming RJ, et al. A mouse model of human mucopolysaccharidosis IX exhibits osteoarthritis, *Human Molecular Genetics*.2008;17(13):1904–1915.PubMed; PMID 18344557.

138. Martins AM. Mucopolissacaridoses – Manual de Orientações (Monografia). São Paulo: Escola Paulista de Medicina – UNIFESP; 2003. [acesso em 13 abr 2013]. Disponível em: <http://www.unifesp.br/centros/creim/downloads/gz-mps-apostila-2003.pdf>.
139. Martins I, Lima I. Ecotoxicologia do manganês e seus compostos. Série Cadernos de Referência Ambiental, v. 7. Salvador, BA: Centro de Recursos Ambientais; 2001.
140. McKusick VA. Heritable Disorders in Connective Tissue. 4th ed. St. Louis: CV Mosby, 1972.
141. McKusick VA, Kaplan D, Wise D, et al. The genetic mucopolysaccharidoses, *Medicine*.1965;44(6):445-483.
142. McKusick VA. Mendelian Inheritance in Man and Its Online Version, OMIM. *Am J Hum Genet*.2007April; 80(4):588-604.
143. Meikle PJ, et al. Prevalence of Lysosomal Storage Disorders. *JAMA*.1999;281:249-254.
144. Meissner A, et al. Genome-scale DNA methylation maps of pluripotent and differentiated cells. *Nature*.2008;454:766-770.
145. Michelletti C, Martins A M. Mucopolissacaridoses. Manual de orientações [Dissertação] [Internet]. São Paulo: Escola Paulista de Medicina – UNIFESP; 2003. [acesso em 13 abr 2013]. Disponível em: <http://www.genzyme.com/thera/az/BR_pdf_patient.pdf>.
146. Millat G, Froissart R, Maire I, Bozon D. Characterization of iduronate sulphatase mutants affecting N-glycosylation sites and the cysteine-84 residue. *Biochem J*.1997;326:243-247.

147. Moreira da Silva I, Froissart R, Marques dos Santos H, Caseiro C, Maire I, Bozon D. Molecular basis of mucopolysaccharidosis type II in Portugal: identification of four novel mutations. *Clin Genet.*2001;60:316–8. PubMed; PMID 11683780.

148. Morris MS, Picciano MF, Jacques PF, Selhub J. Plasma pyridoxal 5'-phosphate in the US population: the National Health and Nutrition Examination Survey, 2003-2004. *Am J Clin Nutr.*2008;87:1446-54.

149. Moura CA. Análise do perfil de expressão do gene SMYD4 em câncer de mama e seu envolvimento na carcinogênese mamária [Dissertação] [internet]. Brasília. Universidade de Brasília. 2013. [acesso em 13 jun 2013]. Disponível em: <http://hdl.handle.net/10482/13029>.

150. Muenzer J, Bodamer O, Burton B, Clarke L, Frenking GS, Giugliani R, Jones S, Rojas MVM, Scarpa M, Beck M, Harmatz P. The role of enzyme replacement therapy in severe Hunter syndrome - an expert panel consensus. *Eur J Pediatr.*2012;171:181-188.

151. Muenzer J, Beck M, Eng CM, Escolar ML, Giugliani R, Guffon NH, Harmatz P, Kamin W, Kampmann C, Koseoglu ST, Link B, Martin RA, Molter DW, Rojas MVM, Ogilvie JW, Parini R, Ramaswami U, Scarpa M, Schwartz IV, Wood RE, Wraith E. Multidisciplinary management of Hunter syndrome. *Pediatrics.*2009 Dec;124(6):1228-39.

152. Muhammad R, Fernhoff P, Rasmussen S, Bowman B, Scanlon K, Grummer-Strawn L, Kettel Khan L. Neurologic Impairment in Children Associated with Maternal Dietary Deficiency of Cobalamin. *Centers for Disease Control (CDC).* 2003 January; 52(04):61-64.

153. National Institute of Occupational and Safety Health (NIOSH). Manganese. Canadian Centre for Occupational and Safety Health. Pocket guide to chemical hazards: 2000 Nov. p

154. National Institute of Neurological Disorders and Stroke > Mucopolysaccharidoses Fact Sheet. Last updated May 06, 2010;[Internet]. Bethesda: American Society of Human Genetics; 2010.[acesso em 13 abr 13]. Disponível em:

http://www.ninds.nih.gov/disorders/mucopolysaccharidoses/detail_mucopolysaccharidoses.htm

155. Natowicz MR, Short MP, Wang Y, Dickersin GR, Gebhardt MC, Rosenthal DI, Sims KB, Rosenberg AE. Brief report: clinical and biochemical manifestations of hyaluronidase deficiency, *New England Journal of Medicine*. 1996; 335(14):1029-1033. PubMed; PMID 8793927.

156. Nelson J. Incidence of the mucopolysaccharidoses in Northern Ireland. *Hum Genet*. 1997 December; 101(3):355-358. Doi:10.1007/s004390050641.

157. Nelson J, Crowhust J, Carey B, Greed L. Incidence of the mucopolysaccharidosis in Western Australia. *Am J Med Genet*. 2003; 123A:310-313.

158. Neufeld EF, Muenzer J. The mucopolysaccharidoses. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, Childs B, Kinzler KW, Vogelstein B. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. 8th edition, Vol. III. McGraw-Hill, Medical Publishing Division; 2001. p ???

159. Nguyen TT, Hayakawa T, Tsuge H. Effect of vitamin B6 deficiency on the synthesis and accumulation of S-adenosylhomocysteine and S-adenosylmethionine in rat tissues. *J Nutr Sci Vitaminol*. 2001; 47(3):188-94.

160. Ochiai T, Ito K, Okada T, Chin M, Shichino H, Mugishima H. Significance of extensive Mongolian spots in Hunter's syndrome. *British Journal of Dermatology*. 2003; 148:1173-78.

161. Parenti G, Meroni G, Ballabio A. The sulfatase gene family. *Curr Opin Genet Dev*. 1997; 7:386-391.

162. Parkinson-Lawrence EJ, Turner C, Hopwood JJ, Brooks DA. Analysis of normal and mutant iduronate-2-sulphatase conformation. *Biochem J*. 2005 March 1; 386(Pt 2): 395-400.

163. Parkinson-Lawrence EJ, Shandala T, Prodoehl M, Plew R, Borlace GN, Brooks DA. Lysosomal Storage Disease: Revealing Lysosomal Function and Physiology. *Physiology*. 2010April;25(2):102-115.
164. Pavarino EC. Padrão de Metilação do DNA genômico e instabilidade de microssatélites em tumores de cabeça e pescoço [Dissertação]. Ribeirão Preto, SP, Brasil. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP). Universidade de São Paulo (USP). Jul 2012.
165. Pearse BM, Smith CJ, Owen DJ. Clathrin coat construction in endocytosis. *Curr Opin Struct Biol*.2000;10:220-8.
166. Pedas P, Husted S, Skytte K, Schjoerring JK. Elevated phosphorus impedes manganese acquisition by barley plants. *Front Plant Sci*. 2011 Aug 5;2:37. Doi: 10.3389/fpls.2011.00037.
167. Pedrosa P. A importância da Vitamina B6 [Monografia]. São Paulo. Associação Brasileira de Medicina Biomolecular (ABMB). Curso de Biologia Aplicada à Medicina São Paulo. 2011.
168. Pena SDJ, Carvalho DR, Santos FR. Utilização de polimorfismos de DNA do cromossomo Y no estudo do povoamento das Américas. *Revista da USP*. Junho/Agosto 1997;34:44:57.
169. Pfeiffer CM, Johnson CL, Jain RB, Yetley EA, Picciano MF, Rader JI. Trends in blood folate and vitamin B-12 concentrations in the United States, 1988-2004. *Am J Clin Nutr*.2007; 86:718-27.
170. Piña-Aguilar RE, Zaragoza-Arévalo GR, Rau I, Gal A, Alcántara-Ortigoza MA, López-Martínez MS, Santillán-Hernández Y. Mucopolysaccharidosis type II in a female carrying a heterozygous stop mutation of the iduronate-2-sulfatase gene and showing a skewed X chromosome inactivation. *European Journal of Medical Genetics*. March 2013;56(3):159-162.

171. Piotrowska E, Jakóbkiewicz-Banecka J, Barańska S, Tylki-Szymańska A, Czartoryska B, Wegrzyn A, Wegrzyn G. Genistein-mediated inhibition of glycosaminoglycan synthesis as a basis for gene expression-targeted isoflavone therapy for mucopolysaccharidoses. *Eur J Hum Genet.* 2006 Jul;14(7):846-52.. PubMed; PMID: 16670689
172. Piquer S, Casas S, Quesada I, Nadal A, Julià M, Novials A, Gomis R. Role of iduronate-2-sulfatase in glucose-stimulated insulin secretion by activation of exocytosis. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2009 Sep;297(3):E793-801. Doi:10.1152/ajpendo.90878.2008.
173. Poorthuis BJ, Wevers RA, Kleijer WJ, Groener JE, de Jong JG, van Weely S, Niezen-Koning KE, van Diggelen OP. The frequency of lysosomal storage diseases in The Netherlands. *Hum Genet.* 1999 Jul-Aug;105(1-2):151-6. PubMed; PMID: 10480370
174. Probst FJ, Roeder ER, Enciso VB, Ou Z, Cooper ML, Eng P, Li J, Gu Y, Stratton RF, Chinault AC, Shaw CA, Sutton VR, Cheung SW, Nelson DL. Chromosomal microarray analysis (CMA) detects a large X chromosome deletion including FMR1, FMR2, and IDS in a female patient with mental retardation. *Am J Med Genet A.* 2007;143A:1358–65.
175. Quintana-Murci L, Marc Fellous. The Human Y Chromosome: The Biological Role of a "Functional Wasteland. *Journal of Biomedicine and Biotechnology.* 2001;1(1):18-24.
176. Ramsahoye BH, Biniszkievicz D, Lyko F, Clark V, Bird AP, Jaenisch R. Non-CpG methylation is prevalent in embryonic stem cells and may be mediated by DNA methyltransferase. *3a. Proc. Natl Acad. Sci USA.* 2000;97:5237-5242.
177. Rathmann M, Bunge S, Beck M, Kresse H, Tylki-Szymanska A, Gal A. Mucopolysaccharidosis type II (Hunter syndrome): mutation "hot spots" in the iduronate-2-sulfatase gene. *Am J Hum Genet.* 1996 December;59(6):1202-1209.
178. Ravikumar B, Futter M, Jahreiss L, Korolchuk VI, Lichtenberg M, Luo S, Massey DC, Menzies FM, Narayanan , Renna M, JimenezSanchez M, Sarkar S, Underwood

B, Winslow A, Rubinsztein DC. Mammalian macroautophagy at a glance. *J Cell Sci.*2009;122:1707-1711.

179. Ray JG, Singh G, Burrows RF. Evidence for Suboptimal Use of Periconceptional Folic Acid Supplements Globally. *BJOG.*2004;111:399-408.

180. Reed GH, Kent JO, Wittwer CT. High-resolution DNA melting analysis for simple and efficient molecular diagnostics. *Pharmacogenomics.*2007; 8:597-608.

181. Reynolds B. Vitamin B12. Who needs and why? *Winter.*2012; 66:18-20.

182. Ribate Molina MP, Pié J, Ramos Fuentes FJ. Síndrome de X Frágil. *Protoc diagn ter pediatr.* 2010; 1:85-90.

183. Robertson KD. DNA methylation, methyltransferases, and cancer. *Oncogene.*2001; 20:3139-55.

184. Rodenhiser D, Mann M. Epigenetics and Human Disease: Translating Basic Biology into Clinical Applications. *CAMJ.*2006; 174(3):341-48.

185. Roels H, Lauwerys R, Genet P, Sarhan MJ, Fays M, Hanotian I, Buchet JP. Relationship between External and Internal Parameters of Exposure to Manganese in Workers from Manganese Oxide and Salt Producing Plant. *Am J Ind Med.*1987; 11:297-305.

186. Rosenblatt DS, Whitehead VM. Cobalamin and Folate Deficiency: Acquired and Hereditary Disorders in Children. *Semin Hematol.* 1999;36:19-34.

187. Sáenz H, Lareo L, Raúl A, Poutou RA, Sosa AC, Barrera LA. Predicción computacional de la estructura terciaria de la iduronato 2-sulfato sulfatasa humana. *Biomédica.*2007mar;27(1):7-20.

188. Sanjurjo-Crespo P. Mucopolisacaridosis do tipo I: aspectos clínicos. *Rev Neurol.*2007;44(sul I):S3-S6.

189. Santos KG, Mehl LE, Moritz-Neto AI, Moura JR, Meló SS, Mangrich IE, Persuhn DC. Relation between polymorphism C677T of the methylenetetrahydrofolate reductase and atherosclerosis. *Acta Bioquím Clín Latinoam*.2010Mar;44(1):230-245.
190. Scarpa M, Almássy Z, Beck M, Bodamer O, Bruce IA, De Meirleir L, Guffon N, Guillén-Navarro E, Hensman P, Jones S, Kamin W, Kampmann C, Lampe C, Lavery CA, Teles EL, Link B, Lund AM, Malm G, Pitz S, Rothera M, Stewart C, Tyłki-Szymańska A, van der Ploeg A, Walker R, Zeman J, Wraith JE. Mucopolysaccharidosis type II: European recommendations for the diagnosis and multidisciplinary management of a rare disease. *Orphanet Journal of Rare Diseases*.2011;6(72):1-18.
191. Schaap T, Bach G. Incidence of mucopolysaccharidoses in Israel: is Hunter disease a Jewish disease? *Hum Genet*. 1980;56:221-223.
192. Schwartz IVD. Estudo clínico, bioquímico e genético de pacientes com mucopolissacaridoses II e de possíveis heterozigotas [Tese]. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Departamento de Genética e Biologia Molecular; 2004.
193. Schwartz IVD, Pinto LLC, Ribeiro MG, Mota JG, Acosta AX, Correia P, Horovitz D, Porciuncula CGG, Lipinski-Figueiredo E, Fett-Conte A, Sobrinho RPO, 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. *J Inherit Metab Dis*. 2009;32:732-738. DOI 10.1007/s10545. 009.1275.9.
194. Schwartz IVD, Boy R. As doenças lisossômicas e o tratamento das mucopolissacaridoses. *Rev Hosp Univ Pedro Ernesto*.2011Ago; 10 Supl 2
195. Schumacher RG, Brzezinska R, Schulze-Frenking G, Pitz S. Sonographic ocular findings in patients with Mucopolysaccharidosis I, II and VI. *Pediatric Radiol* May.2008; 38(5):543-50.
196. Scriver CR. The metabolic & molecular bases of inherited disease. Vol. 4. New York: McGraw-Hill; 2001.

197. Settembre C, Fraldi A, Jahreiss L, Spampanato C, Venturi C, Medina D, de Pablo R, Tacchetti C, Rubinsztein DC, Ballabio A. A block of autophagy in lysosomal storage disorders. *Hum Mol Genet.*2008;17:119-129.
198. Sohn YB, Kim SJ, Park SW, Park HD, Ki CS, Kim CH, Huh SW, Yeau S, Paik KH, Jin DK. A mother and daughter with the p.R443X mutation of mucopolysaccharidosis type II: Genotype and phenotype analysis. *Am J Med Genet A.*2010Dec;152A(12):3129-32.
199. Spyros SS, Theocharis AD, Papageorgakopoulou N, Zagris N. Glycosaminoglycans in early chick embryo. *Int J Dev Biol.*2003;47:311-314.
200. Steluti J, Martini LA, Peters BS, Marchioni DM. Folate, vitamin B6 and vitamin B12 in adolescence: serum concentrations, prevalence of inadequate intakes and sources in food. *J Pediatr.*2011;87(1):43-49.
201. Sukegawa K, Song X, 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 Mutat.*1997; 10:361-367.
202. Swiedler SJ, Beck M, Bajbouj M, et al. Threshold effect of urinary glycosaminoglycans and the walk test as indicators of disease progression in a survey of subjects with mucopolysaccharidosis VI (Maroteaux-Lamy syndrome). *Am J Med Genet.*2005;134:144-150.
203. Tajima G, Sakura N, Kosuga M, Okuyama T, Kobayashi M. Effects of idursulfase enzyme replacement therapy for Mucopolysaccharidosis type II when started in early infancy: comparison in two siblings. *Molecular Genetics and Metabolism.* 2013 March;108(3):172-177.
204. Tang WY, Ho SM. Epigenetic reprogramming and imprinting in origins of disease. *Rev Endocr Metab Disord.*2007;8:173-82.
205. Tchantchou F, Graves M, Falcone D, Shea TB. S-adenosylmethionine mediates glutathione efficacy by increasing glutathione S-transferase activity: implications for

S-adenosyl methionine as a neuroprotective dietary supplement. *J Alzheimers Dis.*2008;14(3):323-328. PubMed; PMID:18599958.

206. Thomson J, Skene P, Selfridge J, Clouaire T, Guy J, Webb S. CpG islands influence chromatin structure via the CpG-binding protein Cfp1. *Nature.*2010;464:1082-6.

207. Timms KM; Edwards FJ; Belmont JW; Yates JR; Gibbs RA. Reassessment of biochemically determined Hunter syndrome carrier status by DNA testing. *J Med Genet.* 1998 35(8): 646-9.

208. Tomatsu S, Orii KO, Bi Y, Gutierrez MA, Nishioka T, Yamaguchi S, Kondo N, Orii T, Noguchi A, Sly WS. General implications for CpG hot spot mutations: methylation patterns of the human iduronate-2-sulfatase gene locus. *Hum Mutat.*2004;23:590-598.

209. Tomatsu S, Sukegawa K, Trandafirescu GC, Gutierrez MA, Nishioka T, Yamaguchi S, Orii T, Froissart R, Maire I, Chabas A, Cooper A, Di Natale P, Gal A, Noguchi A, Sly WS. Differences in methylation patterns in the methylation boundary region of IDS gene in Hunter syndrome patients: implications for CpG hot spot mutations. *European Journal of Human Genetics.*2006;14:838-845.

210. Tuschl K, Gal A, Paschke E, Kircher S, Bodamer OA. Mucopolysaccharidosis type II in females: case report and review of literature. *Pediatr Neurol.*2005;32(4):270-272.

211. Vafiadaki E, Cooper A, Heptinstall LE, Hatton CE, Thornley M, Wraith JE. Mutation analysis in 57 unrelated patients with MPS II (Hunter's disease). *Arch Dis Child.*1998 Sep;79(3):237-41. PubMed; PMID: 9875019

212. van Dam F, van Gool WA. Hyperhomocysteinemia and Alzheimer's disease: A systematic review. *Arch Gerontol Geriatr.*2009;48(3):425-430.

213. van Karnebeek CDM, Stockler S. Treatable inborn errors of metabolism causing intellectual disability: A systematic literature review. *Molecular Genetics and Metabolism.*2012;105(3):368-381.

214. Vieira TA. História natural das mucopolissacaridoses: uma investigação da trajetória do paciente desde o nascimento até o diagnóstico [Dissertação]. Porto Alegre: Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Medicina. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2007.
215. Vieira TA, Schwartz I, Muñoz 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:1741-7.
216. von Schmidt B, Selmer T, Dierks T. A novel protein modification generating an aldehyde group in sulfatases: its role in catalysis and disease. *Bioessays.* 1998; 20:505-510.
217. Voznyi YV, Keulemans JLM, Beyer EM, van Diggelen OP. A fluorogenic assay for the diagnosis of Hunter disease (MPS II). *J Inher Metab Dis.*2001; 24:675-80.
218. Wang HX, Wahlin A, Basun H, Fastbom J, Winblad B, Fratiglioni L. Vitamin B(12) and folate in relation to the development of Alzheimer's disease. *Neurology.*2001; 56:1188-1194.
219. Wardlaw GM, Kessel M. *The Water-Soluble Vitamins: Perspectives in Nutrition.* 5th ed. New York, NY: McGraw-Hill 2002.
220. Wegrzyn G. Effects of flavonoids on expression of genes coding for proteins involved in glycosaminoglycan metabolism. Poland–Warsaw. 13TH International Symposium on Mucopolysaccharidoses and related diseases. Bahia – Brazil. 2013
221. Werder SF. Cobalamin deficiency, hyperhomocysteinemia and dementia. *Neuropsychiatric Disease and Treatment.*2010;6(1):159-195.
222. White HE, Hall VJ, Cross NCP. Methylation-sensitive high-resolutionmelting-curve analysis of the SNRPN gene as a diagnostic screen for Prader–Willi and Angelman Syndromes. *Clin Chem.*2007;53:1960-1962.
223. Whitley CB. The mucopolysaccharidoses. In: Beighton P. *McKusick's Heritable Disorders of Connective Tissue.* St Louis: Mosby; 1993. p. 367-498.

224. Wilcox WR. Lysosomal storage disorders: the need for better pediatric recognition and comprehensive care. *J Pediatr*.2004;144:S3–S14.
225. Wilson PJ, Suthers GK, Callen DF, Baker E, Nelson PV, Cooper A, Wraith JE, Sutherland GR, Morris CP, Hopwood JJ. Frequent deletions at Xq28 indicate genetic heterogeneity in Hunter syndrome. *Hum Genet*.1991;86:505-508.
226. Wilson PJ, Morris CP, Anson DS, Occhiodoro T, Bielicki J, Clements PR, et al. Hunter syndrome: isolation of a iduronate-2-sulfatase cDNA clone and analysis of patient DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*.1990; 87:8531-5.
227. Wilson PJ, Meaney CA, Hopwood JJ, Morris CP. Sequence of the human iduronate 2-sulfatase (IDS) gene. *Genomics*.1993; 17:773-76.
228. Winchester B, Young E, Geddes S, Genet S, Hurst J, Middleton-Price H, Williams N, Webb M, Habel A, Malcolm S. Female twin with Hunter disease due to nonrandom inactivation of the X-chromosome: a consequence of twinning. *Am J Med Genet*.1992; 44:834-838. PubMed; PMID 1481858.
229. Wojdacz TK, Dobrovic A. Methylation-sensitive high resolution melting (MS-HRM): a new approach for sensitive and high-throughput assessment of methylation. *Nucleic Acids Res*. 2007; 35(6):1-7. Doi: 10.1093/nar/gkm013.
230. Wong CH, Whitesides G M. *Enzymes in Synthetic Organic Chemistry, Tetrahedron Organic Chemistry Series, v.12*. Oxford: Elsevier Science Ltda; 1994.
231. World Health Organization. *Manganese*. Geneva, 1981.
232. World Health Organization. *Concise International Chemical Assessment Document n.o 12. Manganese and its compounds*. Geneva, 1999.
233. Wraith JE, Beck M, Giugliani R, Clarke J, Martin R, Muenzer J. Initial report from the Hunter Outcome Survey. *Genet Med*.2008 Jul;10(7):508-16. Doi: 10.1097/GIM.0b013e31817701e6. PubMed; PMID: 18580692.
234. Wraith JE, Scarpa M, Beck M, Bodamer AO, De Meirleir L, Guffon N, Lund AM, Malm G, van der Ploeg A, Zeman J. Mucopolysaccharidosis type II (Hunter

syndrome): a clinical review and recommendations for treatment in the era of enzyme replacement therapy. *Eur J Pediatric*.2008;167:267-277.

235. Yatziv S, Erickson RP, Epstein CJ. Mild and severe Hunter syndrome (MPS II) within the same sibships. *Clin Genet*.1977;11:319-326.

236. Young ID, Harper PS. Incidence of Hunter's syndrome. *Hum Genet*.1982;60(4):391-2. Doi:10.1007/BF00569230. PubMed; PMID 6809596.

237. Young ID, Harper PS, Newcombe RG, Archer IM. A clinical and genetic study of Hunter's syndrome: differences between the mild and severe forms. *J Med Genet*.1983;19:408-11.

238. Zhang HW, Li J, Zhang XS, Wang Y, Qiu W, Ye J, Han I, Gao X, Gu X. Analysis of the IDS Gene in 38 Patients with Hunter Syndrome: The c.879G>A (p.Gln293Gln) Synonymous Variation in a Female Create Exonic Splicing. *PLoS ONE*.2011August;6(8):229-51. Doi:10.1371/journal.pone.0022951.

239. Zhang XS, Zhang HW, Gu XF. Prenatal diagnosis of mucopolysaccharidosis type II. *journal of medical genetics*. 2011Oct;28(5):536-8. Doi: 10.3760/cma.j.issn.1003-9406.2011.05.014.

240. Zhou L, Vandersteen J, Wang L, Fuller T, Taylor M, Palais B. High-resolution DNA melting curve analysis to establish HLA genotypic identity. *Tissue Antigens*.2004;64:156-64.

241. Ziller MJ, Müller F, Liao J, Zhang Y, Gu H, Bock C, Boyle P, Epstein CB, Bernstein BE, Lengauer T, Gnirke A, Meissner A. Genomic Distribution and Inter-Sample Variation of Non-CpG Methylation across Human Cell Types. *PLoS Genet*.2011December;7(12):1 -15. Doi:10.1371/journal.pgen.1002389.

242. Zimmer da Silva C. Espectro de mutações em MPS II de pacientes brasileiros [Tese]. Porto Alegre. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. UFRGS; 2011.

243. Zlotogora J, Bach G. Hunter syndrome: prenatal diagnosis in maternal serum. *Am J Hum Genet*.1986;38:253-260. PubMed; PMID 3080875.

244. Zlotogora J, Schaap T, Zeigler M, Bach G. Hunter syndrome in Jews in Israel: further evidence for prenatal selection favoring the Hunter allele. *Hum Genet.* 1991;86h53min-533. PubMed; PMID 1901828.

(*) As citações bibliográficas obedeceram ao estilo Vancouver, de acordo com Martinez AME. Normas de Referências Conforme o Estilo de Vancouver [Monografia]. Presidente Prudente – SP: Universidade do Oeste Paulista- UNOESTE; 2011.