



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR
LABORATÓRIO DE ERROS INATOS DO METABOLISMO

MISLENE CISZ

**AVALIAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA, GENÉTICA E BIOQUÍMICA DE PACIENTES
COM MUCOPOLISSACARIDOSES NO ESTADO DO PARÁ**

Belém/PA
2023

MISLENE CISZ

**AVALIAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA, GENÉTICA E BIOQUÍMICA DE PACIENTES
COM MUCOPOLISSACARIDOSES NO ESTADO DO PARÁ**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal do Pará como requisito parcial para obtenção do grau de doutor em Genética e Biologia Molecular.

Orientador: Prof. Dr. João Farias Guerreiro

Coorientador: Prof. Dr. Luiz Carlos Santana da Silva

Belém/PA
2023

Dados Internacionais de Catalogação na publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFPA

C579a

Cisz, Mislene

Avaliação epidemiológica, genética e bioquímica de pacientes com mucopolissacaridoses no estado do Pará. / Mislene Cisz – 2023.

Orientador: João Farias Guerreiro;

Coorientador: Luiz Carlos Santana da Silva.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Belém, 2023.

1. MPS. 2. Doença hereditária. 3. Clínica e Diagnóstico. 4. Genótipo/Fenótipo. I. Título.

CDD 23. ed. 571.05098115

MISLENE CISZ

**AVALIAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA, GENÉTICA E BIOQUÍMICA DE PACIENTES
COM MUCOPOLISSACARIDOSES NO ESTADO DO PARÁ**

Defesa de Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal do Pará como requisito parcial para obtenção do grau de doutor em Genética e Biologia Molecular.

Tese apresentada e aprovada em: 30 / 06 / 2023.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. João Farias Guerreiro (LGHM/UFPA – Orientador)

Prof. Dr. Luiz Carlos Santana da Silva (ICB/UFPA – Coorientador)

Prof. Dr. André Salim Khayat (PPGBM - PPGOCM / ICB / UFPA)

Profa. Dra. Isabel Cristina Neves de Souza (HUBFS / ICS / UFPA)

Profa. Dra. Lavinia Schuler Faccini (PPGBM / UFRGS)

Prof.^a Dra. Giovanna Chaves Cavalcante (PPGBM / ICB / UFPA)

INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS

- Instituto de Ciências Biológicas (ICB)
- Universidade Federal do Pará (UFPA)
- Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo (LEIM)
- Laboratório de Genética Humana e Médica (LGHM)
- Instituto Nacional de Pesquisa e Genética Médica e Populacional (INAGEMP/CNPq).

“A raridade de uma doença não
exclui a sua existência”.
(Luiz Santana)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a minha família, que é meu incentivo para sempre continuar lutando. A minha filha Carolina Cisz Sena por todo amor, apoio, compreensão e por muitas vezes ser mais mãe do que filha, sempre preocupada se eu me alimentei ou consegui dormir. Ao Carlos Davi por todo carinho e amor.

Ao meu esposo Alberto Sena, por ser meu alicerce e companheiro, em especial nos momentos difíceis. As minhas filhas do coração, Larissa Sena e Luana Sena por todo apoio e pelos netos lindos que me deram, Livia Sophia e Daniel, que fazem a minha vida muito mais colorida.

A minha mãe e irmãos que mesmo de longe sempre estão sempre torcendo e orando por mim, e aos demais familiares e amigos de perto e de longe, por seu constante apoio, orações e torcida.

Ao meu coorientador Prof. Dr. Luiz Carlos Santana da Silva, por sua dedicação e compromisso constante, compartilhando seus conhecimentos. Pelo companheirismo e amizade, apoio e compreensão, que foram fundamentais para que eu conseguisse conciliar os trabalhos e os estudos.

Ao meu orientador, Prof. Dr. João Guerreiro, pela oportunidade e confiança depositada neste trabalho.

Ao Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo da UFPA e seus integrantes. Em especial a Geralda por toda ajuda e compreensão, a Rosany, por toda ajuda, amizade e ensinamentos compartilhados.

Ao Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, e ao Hospital Universitário Bettina Ferro de Souza, pela parceria neste projeto.

A todos que de alguma forma contribuíram direta ou indiretamente neste processo de crescimento pessoal e profissional.

Por fim, agradeço à Universidade Federal do Pará, por ser minha casa de crescimento pessoal, profissional e intelectual.

RESUMO

As mucopolissacaridoses (MPS) compõem um grupo de 7 síndromes, causadas pela deficiência de uma das 11 enzimas, atuantes em uma das etapas de degradação dos glicosaminoglicanos (GAG). Essa deficiência leva ao armazenamento de GAG no organismo e a uma série de consequências clínicas. Este estudo visa o relato dos achados epidemiológico, genético e bioquímicos dos pacientes com MPS diagnosticados no estado do Pará. Os dados clínicos e bioquímicos foram obtidos a partir das fichas de anamnese do Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo (LEIM-UFGA). As amostras de DNA foram sequenciadas no Serviço de Genética Médica do Hospital das Clínicas de Porto Alegre (SGM-HCPA), utilizando painel customizado para MPS. As estatísticas descritivas e as variáveis foram resumidas por meio de contagens e porcentagens da amostra total. A média de idade ao diagnóstico foi de 7,9 anos. A pesquisa evidenciou um diagnóstico tardio, e prejudicial ao tratamento. Atribui-se a este fato a semelhança dos sintomas com outras patologias e a ausência da testagem neonatal. Os fenótipos apresentados condizem com a literatura para cada tipo de MPS. Exames bioquímicos foram efetivos tanto para o diagnóstico como para o acompanhamento. A Terapia de reposição enzimática (TRE) mostrou-se efetiva, porém ainda não contempla todos os tipos da doença. A avaliação molecular mostrou-se fundamental para prever o curso da doença e para o aconselhamento genético. Conseguimos identificar 3 mutações ainda não descritas na literatura (MPS II, IIIB E VII). As MPS têm apresentação clínica multissistêmica, necessitando, portanto, de um acompanhamento multidisciplinar.

Palavra-chave: Mucopolissacaridose, epidemiologia, bioquímica, genética.

ABSTRAT

Mucopolysaccharidoses (MPS) make up a group of 7 syndromes, caused by the deficiency of one of the 11 enzymes, active in one of the stages of degradation of glycosaminoglycans (GAG). This deficiency leads to the storage of GAG in the organism and to a series of clinical consequences. This study aims to report the epidemiological, genetic and biochemical findings of patients with MPS diagnosed in the state of Pará. Clinical and biochemical data were obtained from the anamnesis records of the Laboratory of Innate Metabolism Errors (LEIM-UFPA). DNA samples were sequenced at the Medical Genetics Service of Hospital das Clínicas de Porto Alegre (SGM-HCPA), using a customized panel for MPS. Descriptive statistics and variables were summarized using counts and percentages of the total sample. The mean age at diagnosis was 7.9 years. The research showed a late diagnosis, and harmful to the treatment. This fact is attributed to the similarity of symptoms with other pathologies and the absence of neonatal testing. The phenotypes shown are consistent with the literature for each type of MPS. Biochemical tests were effective for both diagnosis and follow-up. Enzyme replacement therapy (ERT) proved to be effective, but it still does not cover all types of the disease. Molecular evaluation proved to be fundamental for predicting the course of the disease and for genetic counseling. We were able to identify 3 mutations not yet described in the literature (MPS II, IIIB and VII). MPS has a multisystemic clinical presentation, therefore requiring multidisciplinary follow-up.

Keywords: Mucopolysaccharidosis, epidemiology, biochemistry, genetics.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 -	Cadeia polissacarídica observada nos glicosaminoglicanos	17
Figura 02 -	Rota metabólica da degradação do DS e rota com enzima deficiente	18
Figura 03 -	Esquema mórbido das mucopolissacaridoses	19
Figura 04 -	Epidemiologia das MPS	23
Figura 05 -	Estrutura tridimensional da enzima alfa-L-iduronidase (IDUA)	24
Figura 06 -	Estrutura tridimensional da enzima humana	27
Figura 07 -	Estrutura representativa da enzima SGSH	29
Figura 08 -	Estrutura representativa da enzima NAGLU humana	30
Figura 09 -	Estrutura tridimensional da enzima HGSNAT humana	32
Figura 10 -	Estrutura representativa da enzima GALNS	33
Figura 11 -	Modelo terciário da proteína GALNS humano	34
Figura 12 -	Estrutura representativa da enzima ARSB	35
Figura 13 -	Estrutura representativa da Beta-glucuronidase humana	37
Figura 14a-	Principais fenótipos das MPS	38
Figura 14b-	Principais fenótipos das MPS	40
Figura 14c-	Principais fenótipos das MPS	41
Figura 15 -	Fluxograma para o diagnóstico das MPS	44
Figura 16 -	Estratégias de terapia gênica in vivo e terapia gênica ex vivo	51
Figura 17 -	A terapia farmacológica com chaperonas	53
Figura 18 -	Turvação observada em urina positiva para MPS no teste de BCTMA	59
Figura 19 -	Visualização de manchas com coloração púrpura metacromática no teste do Azul de Toluidina.	59
Figura 20 -	Eletroforese em gel de agarose	61
Figura 21 -	Pacientes com suspeita de MPS atendidos no LEIM/UFPA no período de 01/2003 a 12/2022	62
Figura 22 -	Idade do diagnóstico de MPS	65
Figura 23 -	Faixa etária de diagnóstico de pacientes com MPS no estado do Pará	66
Figura 24 -	Idade de início dos sintomas em pacientes com MPS	67
Figura 25 -	Primeira dosagem de gag urinário	72
Figura 26 -	Dosagem de GAG após TER	73

Figura 27 -	Resultado de predição de efeito funcional na proteína pela ferramenta SIF	81
Figura 28-	Resultado de predição de efeito funcional na proteína pela ferramenta Mutation Taster	81
Figura 29	Resultado de predição de efeito funcional na proteína pela ferramenta PROVERAN.	83
Figura 30-	Resultado de predição de efeito funcional na proteína pela ferramenta MUTATION TASTER.	83
Figura 31-	Resultado de predição de efeito funcional na proteína pela ferramenta Poliphen-2	90
Figura 32-	Resultado de predição de efeito funcional na proteína pela ferramenta PROVEAN.	90
Figura 33-	Resultado de predição de efeito funcional na proteína pela ferramenta SIFT.	90
Figura 34-	Resultado de predição de efeito funcional na proteína pela ferramenta MUTATION TASTER	91
Figura 35-	Estrutura esquemática do resíduo de aminoácido Leucina e do resíduo de aminoácido mutante Prolina, na posição 292	91
Figura 36-	Representação em 3D da proteína mutada.	92
Figura 37-	A. Close da mutação p.Leu292Pro	92

LISTA DE QUADROS

Quadro 01	Classificação das mucopolissacaridoses	20
Quadro 02	Sinais e sintomas que devem levantar suspeita clínica de MPS	39
Quadro 03	Grupos de alto risco para MPS / diagnósticos diferenciais	42
Quadro 04	Amostras biológicas utilizadas no ensaio enzimático para diagnóstico de diferentes tipos de MPS.	61
Quadro 05	Estudo molecular	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 01-	Valor de referência para dosagem urinária de acordo com a faixa etária	60
Tabela 02-	Fenótipos apresentados neste estudo que podem ser sugestivos de MPS	68
Tabela 03-	Valores de atividade enzimática em matérias diversos	75

LISTA DE SIGLAS

AAV	vírus adeno-associados
ANVISA-Brasil	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ARSB	Arilsulfatase B
AV	Adenovírus
BCTMA	Brometo de Cetil-Trimetil-Amônio
BHE	Barreira hematoencefálica
CGH	Hibridização genômica comparativa
CPAP	Aparelho de pressão positiva do ar
CRISPR	<i>clustered regularly interspaced short palindromic repeat</i>
CS	Condroitin sulfato (termo em portugues Sulfatos de Condroitina)
C6S	Condroitina-6-sulfato
DATASUS	Banco de Dados do Sistema Único de Saúde
DLD	Doenças lisossômicas de depósito
DS	Dermatan sulfato
EIM	Erros Inatos do Metabolismo
ExAC	<i>Exoma Aggregation Consortium</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GAG	Glicosaminoglicanos
GALNS	N-acetilgalactosamina-6-sulfato sulfatase
GLB 1	Beta-galactosidase
gnomAD	Banco de Dados de Agregação de Genomas
GNS	N-acetilglucosamina 6-sulfatase
GUSB	Beta-glicuronidase
HGMD	<i>Human Gene Mutation Database</i>
HGSNAT	Heparan sulfato acetil-CoA:α-glucosaminide N-acetiltransferase
HOP	Human and Organizational Performance
HOS	<i>Hunter Outcome Survey</i>
HS	Heparan sulfato
IDS	Iduronato-sulfatase
IDUA	Alfa-L-iduronidase
LV	Lentivírus

MPS	Mucopolissacaridoses
MPSPS	MPS Plus
NAGLU	α -N-acetilglucosaminidase
PNTN/SUS	Programa de Triagem Neonatal do Sistema Único de Saúde
QF-PCRs	Quantitativas fluorescentes-PCRs
QS	Queratan sulfato
rhGUS	β -glucuronidase humana recombinante
RV	Retrovírus
SGHS	Heparan-N-sulfatase
SGM/HCPA	Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre
SGSH	N-sulfoglucosamina sulfohidrolase
SINASC	Sistema de Informações sobre Nascidos Vivos
SNC	Sistema Nervoso Central
SUS	Sistema Único de Saúde
TALENs	<i>Transcription activator-like effector nucleases</i>
TCTH	Transplante de células tronco hematopoiéticas
TMO	Transplante de medula óssea
TRE	Terapia de Reposição Enzimática
TRS	Terapia de Redução do Substrato
ZFNs	<i>Zinc finger nucleases</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	17
1.1 Mucopolissacaridoses (MPS).....	17
1.1.1 Padrão de Herança nas MPS.....	21
1.2 Aspectos epidemiológicos.....	21
1.3 Bases moleculares das MPS.....	24
1.3.1 Mucopolissacaridose I (MPS I) (Hurler, Hurler/Scheie, Scheie)	24
1.3.2 Mucopolissacaridose II (MPS II) (Síndrome de Hunter)	26
1.3.3 Mucopolissacaridose III (Síndrome de Sanfilippo)	28
1.3.4 Mucopolissacaridose IV (MPS IV)	32
1.3.5 Mucopolissacaridose VI (MPS VI) (síndrome de Maroteaux-Lamy)	34
1.3.6 MPS VII (Síndrome de Sly)	36
1.4 Fenótipos clínicos	37
1.5 Diagnóstico laboratorial das MPS.....	42
1.6 Tratamento das MPS.....	45
1.6.1 Transplante de Medula Óssea / Transplante de Células Tronco Hematopoiéticas (TMO/TCTH)	46
1.6.2 Terapia de Reposição Enzimática (TRE).....	47
1.6.3 Terapia de Inibição da Síntese do Substrato.....	50
1.6.4 Terapia Gênica.....	50
1.6.5 Chaperonas.....	52
1.6.6 Tratamento Suporte.....	54
2 OBJETIVOS.....	56
2.1 Objetivo Geral.....	56
2.2 Objetivos Específicos.....	56
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	57
3.1 Caracterização da Amostra.....	57
3.1.1. Estudo Epidemiológico das MPS no Estado do Pará	57
3.1.2 Aspectos Éticos	57
3.1.3 Análise Bioquímica e Molecular.....	58
3.1.4 Coleta e Armazenamento das Amostras.....	58
3.2 Protocolos laboratoriais empregados na investigação de MPS.....	59

3.2.1 Triagem Urinária (Método Qualitativo)	59
3.2.2. Quantificação de GAG Urinários (método quantitativo)	60
3.2.3 Eletroforese de GAG.....	60
3.2.4 Ensaio Enzimáticos.....	61
3.2.5 Estudo Molecular.....	62
4 ANÁLISE DE DADOS	63
5 RESULTADO E DISCUSSÃO	64
5.1. Perfil epidemiológico das MPS no Estado do Pará.....	64
5.2. Características clínicas dos pacientes com MPS.....	67
5.2.1 MPS I	69
5.2.2 MPS II	69
5.2.3 MPS III	69
5.2.4 MPS IV A.....	70
5.2.5 MPS VI	70
5.2.6 MPS VII	71
5.3 Análise Bioquímica de Pacientes com MPS	71
5.3.1. Triagem Urinária.....	71
5.3.2 Dosagem De Gag.....	72
5.3.3 Dosagem Enzimática.....	73
5.4 Análise molecular.....	76
5.4.1- MPS I	78
5.4.2- MPS II	79
5.4.3- MPS III	82
5.4.4- MPS IV A	86
5.4.5- MPS VI	87
5.4.6- MPS VII	89
6 CONCLUSÃO.....	94
REFERÊNCIAS.....	96
ANEXOS.....	119

1 INTRODUÇÃO

1.1 Mucopolissacaridoses (MPS)

As MPS são o segundo grupo de maior prevalência dentre as Doenças Lisossômicas de Depósito (DLD), após as esfingolipidoses. Compreendem oito síndromes classificadas pela deficiência total ou parcial de uma das 11 enzimas atuantes em uma etapa específica da degradação dos glicosaminoglicanos (GAG) causando seu acúmulo patológico. Possuem alta heterogeneidade fenotípica e genotípica, distúrbios multissistêmicos progressivos com penetração e severidade variáveis, que iniciam desde o período fetal, até a intensa progressão dos sintomas na fase infantil geralmente não aparentes ao nascimento tornando o diagnóstico precoce e preciso desafiador (BRUSIUS-FACCHIN *et al.*, 2018; SUN, 2018; FLANIGAN, 2021; FARAGUNA *et al.*, 2022).

Os GAG são cadeias polissacarídicas não ramificadas compostas de unidades dissacarídicas repetidas, como pode ser observado na figura 01. São denominados GAG porque um dos açúcares no dissacarídeo repetido é sempre um amino açúcar (N-acetilglucosamina ou N-acetilgalactosamina) o qual, na maioria das vezes, é sulfatado. O segundo açúcar é, normalmente, um ácido urônico (glucurônico ou idurônico). Possuem alta densidade de cargas negativas conferidas pela presença de grupamentos carboxílicos dos ácidos urônicos e grupamentos sulfatos, atraindo íons de sódio e conseqüentemente a água. Quando absorvem uma grande quantidade de água, acabam adquirindo uma consistência mucóide, viscosa, garantindo sua função lubrificante, de suporte e união entre tecidos, porém o acúmulo exacerbado é patogênico (ALBERTS *et al.*, 2004; COUTINHO *et al.*, 2012).

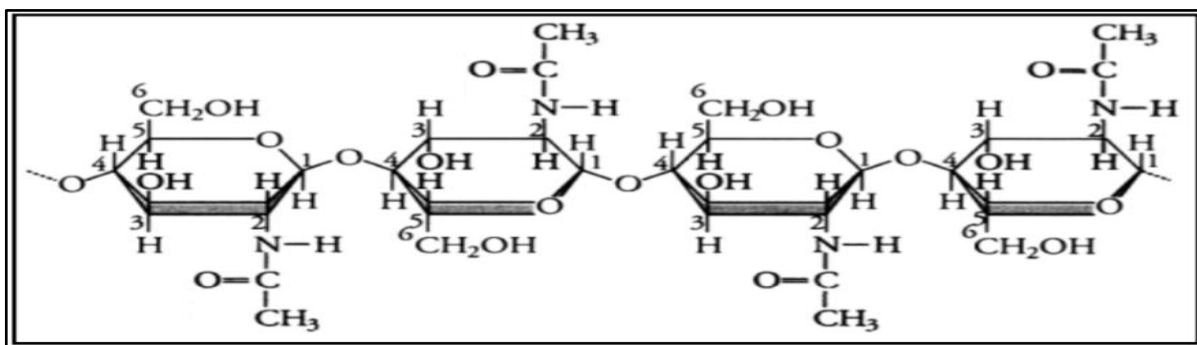


Figura 01 - Cadeia polissacarídica observada nos glicosaminoglicanos. **Fonte:** Alberts *et al.*, (2004).

A natureza do monossacarídeo que compõe os dissacarídeos, o tipo de ligação, número e localização dos grupos sulfatos definem o tipo de GAG: heparan sulfato (HS), dermatan sulfato (DS), condroitin sulfato (CS) A e C, queratan sulfato (QS) I e 4 II, ácido hialurônico e heparina. Cada um tem uma única estrutura constituída de unidades repetidas de dissacarídeos. (COUTINHO *et al.*, 2012; FUJITSUKA *et al.*, 2019).

O HS está presente na matriz extracelular e na membrana basal fornecendo suporte, resistência ao estresse mecânico, agindo como reservatório de quimiocinas e fatores de crescimento, podendo também atuar como receptor. O DS é amplamente distribuído nos tecidos, além de ser responsável pela transparência da córnea. Outro GAG também presente na córnea é o QS I. O QS II é encontrado principalmente em tecido conjuntivo frouxo. Os CS A e C são encontrados, principalmente, no interior de alguns neurônios, proporcionando suas estruturas endo-esqueléticas. O ácido hialurônico é encontrado em grandes quantidades em tecidos embrionários, sendo também um importante lubrificante das articulações (NELSON; COX, 2000; MURRAY *et al.*, 2006; FUJITSUKA *et al.*, 2019).

Os GAG passam por um curso natural de degradação onde várias enzimas diferentes são responsáveis pelo processo. Quando uma ou mais enzimas estão deficientes a rota metabólica é alterada, causando uma desordem metabólica que leva ao acúmulo intralissossomal de resíduos desses substratos (figura 02) (SCRIVER, 2001).

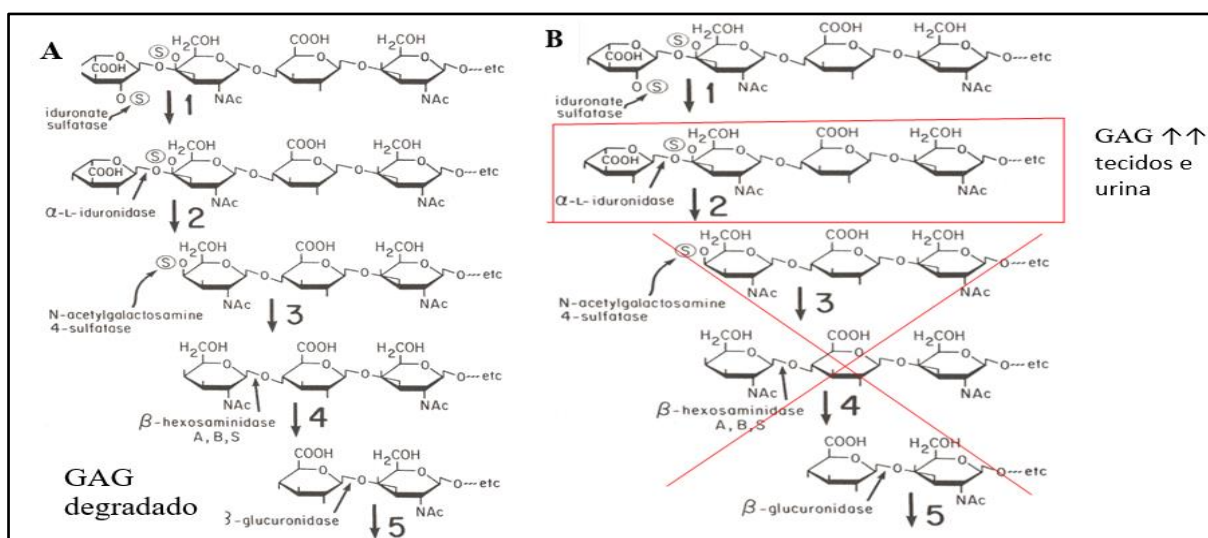


Figura 02 - Rota metabólica da degradação do DS e rota com enzima deficiente.

Fonte: Adaptado de SCRIVER, 2001 "A" rota de degradação normal. "B" rota com enzima deficiente.

Com uma rota metabólica deficiente, os lisossomos incham, ocupam cada vez mais o citoplasma aumentando a excreção dos GAG na urina, sangue e líquido cefalorraquidiano e acúmulo indevido em diversos tecidos orgânicos (figura 03). Esse acúmulo leva a patologia, que apresenta diversas manifestações clínicas (ALBERTS *et al.*, 2004; Clarke, 2008; SAFARY, 2019).

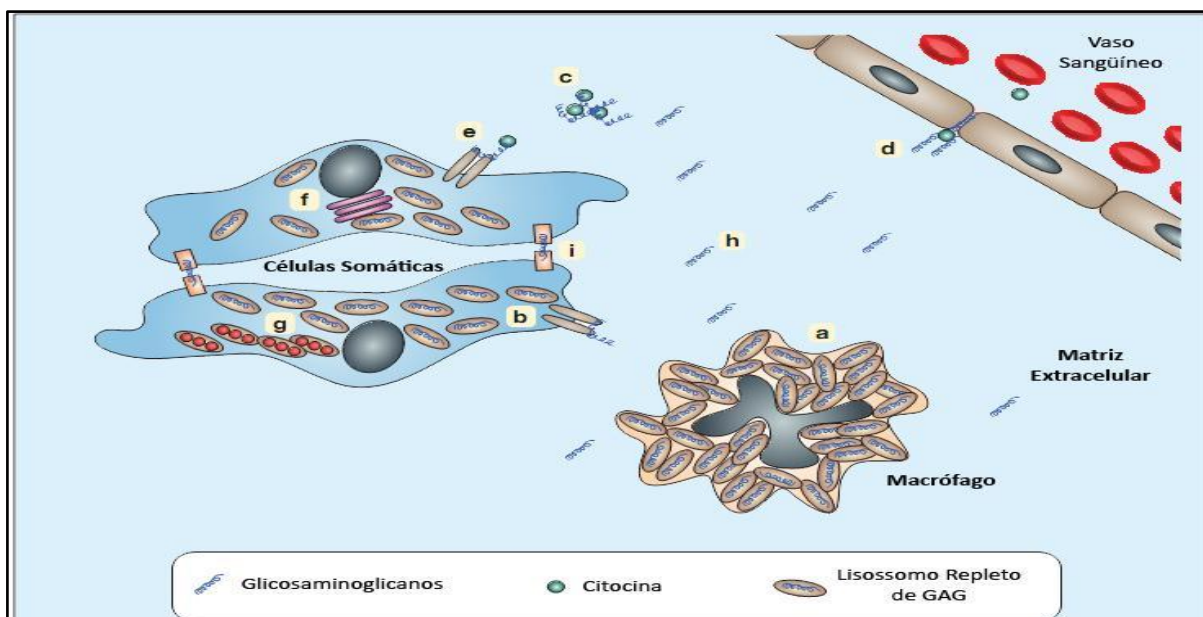


Figura 03 - Esquema mórbido das Mucopolissacaridoses **Fonte:** Adaptado de Clarke, 2008.

Nota: A figura ilustra os diversos processos fisiológicos que podem ser afetados pela deficiência na degradação de GAG, com consequente aumento do depósito desses compostos na matriz extracelular. (a) Macrófago disfuncional em função do acúmulo de GAG nos lisossomos; (b) padrão alterado de receptores da membrana plasmática; (c) Alteração na captação de citocinas e fatores de crescimento; (d) alteração no recrutamento de citocinas circulantes; (e) Alteração na apresentação de citocinas aos receptores; (f) interferência no tráfego celular; (g) Depósito lisossômico adicional pela interferência de hidrolases lisossomais; (h) interações anormais da matriz extracelular; (i) adesão celular alterada.

A classificação das MPS se dá através do tipo de GAG acumulado, da atividade enzimática deficiente e da localização dos genes envolvidos. Juntas compõem 12 diferentes tipos e subtipos de desordens monogênicas causadas pela deficiência, parcial ou total, de uma das 11 enzimas responsáveis por catalisar a degradação dos GAG, exceto na MPS Plus (MPSPS) que não tem enzima identificada (VASILEV *et al.*, 2020). Cada uma resulta em um subtipo diferente de MPS de acordo com a gravidade fenotípica. Para a MPSPS não foi relatada deficiência de enzima lisossomal (quadro 1) (NEUFELD; MUENZER, 2001; DATTA *et al.*, 2014; KONDO *et al.*, 2017; BRUSIUS-FACCHIN *et al.*, 2018; SAFARY, 2019; MCBRIDE; FLANIGAN, 2021).

Quadro 01 - Classificação das mucopolissacaridoses.

Tipo de MPS	Epônimo	GAGs na urina	Deficiência Enzimática	Gene	Localização do gene
MPS I H	Hurler	DS + HS	α -L-Iduronidase	<i>IDUA</i>	4p 16.3
MPS I H/S	Hurler-Scheie	DS + HS	α -L-Iduronidase	<i>IDUA</i>	4p 16.3
MPS IS	Scheie	DS + HS	α -L-Iduronidase	<i>IDUA</i>	4p 16.3
MPS II (grave)	Hunter	DS + HS	Iduronato sulfatase	<i>IDS</i>	Xq28
MPS II (leve)	Hunter	DS + HS	Iduronato sulfatase	<i>IDS</i>	Xq28
MPS III A	Sanfilippo A	HS	Heparan-N-sulfatase	<i>SGSH</i>	17q25.3
MPS III B	Sanfilippo B	HS	α -N-Acetil-glicosaminidase	<i>NAGLU</i>	17q21
MPS III C	Sanfilippo C	HS	Acetil-CoA: α -glicosamina acetiltransferase	<i>HGSNAT</i>	8p11.1
MPS III D	Sanfilippo D	HS	N-acetilglicosamina 6-sulfatase	<i>GNS</i>	12q14
MPS IV A	Morquio A	QS	Galactose-6-sulfatase	<i>GALNS</i>	16q24.3
MPS IV B	Morquio B	QS	β -galactosidase	<i>GLB 1</i>	3p21.33
MPS VI	Maroteaux-Lamy	DS	Arilsulfatase B	<i>ARSB</i>	5q13-q14
MPS VII	Sly	DS + HS	β -glicuronidase	<i>GUSB</i>	7q21.11
MPS IX	Natowicz	CS	Hialuronidase	<i>HYAL1</i>	3p21.1-p21.3
MPS PS	Síndrome MPS-PLUS	HS	Sem enzima deficiente	<i>VPS33A</i>	12q24

Fonte: Adaptada de Kowalewski *et al.*, (2012); VASILEV *et al.*, (2020). DS: dermatan sulfato; HS: heparan sulfato; QS: queratan sulfato; CS: condroitin sulfato; HAR: herança autossômica recessiva; HLX: Herança ligada ao X; H: Hurler; S: Scheie; HS: Hurler-Scheie.

Kowalewski *et al.*, (2012) descreveram um quinto subtipo de MPS III associado à deficiência de arilsulfatase G (também denominada de N-glucosamine 3-O-sulfatase). Foi observado em cães e camundongos o acúmulo de heparan sulfato

resultante da deficiência enzimática da arilsulfatase G. Esta alteração causa neuropatologia e defeitos comportamentais característicos de outros subtipos da doença de Sanfilippo. Ainda não existem relatos em humanos portadores desta deficiência.

1.1.1 Padrão de Herança nas MPS

A herança autossômica recessiva se manifesta em homozigose ou heterozigose composta, necessitando de um par de genes alelos recessivos em cromossomos homólogos autossomos. Com uma probabilidade de 25% por casal portador de ter uma criança afetada em cada gestação. Este tipo de herança ocorre na maioria das MPS (YOON *et al.*, 2019, HAMPE *et al.*, 2021).

Na MPS II é a única de herança ligada ao cromossoma X, sendo a chance de transmiti-la de 50% para o sexo masculino. Homens que herdaram a variante patogênica serão afetados, já as mulheres que herdaram a variante patogênica serão portadoras. Somente 10 casos foram relatados de mulheres com apresentação patogênica da MPS II por inativação aleatória do cromossomo X. O mosaicismismo germinativo (pró-zigótico) também tem sido observado. Os homens afetados não passam a variante patogênica para seus filhos, porém todas as suas filhas serão portadoras (CUDRY *et al.*, 2000; TUSCHL, 2005; THORPE *et al.*, 2020).

1.2 Aspectos epidemiológicos

Os Erros Inatos do Metabolismo (EIM) são individualmente raros, mas juntos podem atingir uma frequência de 1:1.000 indivíduos, e já foram descritos mais de 900 EIM (BITENCOURT *et al.*, 2019). As Doenças Lisossômicas de Depósito correspondem a 59,8% dos EIM diagnosticados. A incidência das DLD é geralmente estimada em 1:5.000 nascidos vivos. Porém, vários estudos de triagem neonatal em massa têm apontado que esta incidência pode estar subestimada (BOY, 2011; GIUGLIANI, 2016).

As MPS possuem uma incidência muito variável e estudos relatam uma incidência geral estimada entre 1:25.000 a 1:100.000 nascidos vivos (ZANETTI *et al.*, 2019; REMONDINO *et al.*, 2019; YOON *et al.* 2019, FEDERHEN, *et al.* 2020).

As MPS I, II e VI são consideradas as mais frequentes, e a MPS IX tem sido a mais rara. Acredita-se que devido a MPS IX não apresentar aumento de GAG, muitos casos podem estar subdiagnosticados (KIYKIM *et al.* 2015; BORGES, *et al.* 2020). Brusius-Facchin *et al.*, (2018) relataram a MPSPS, não estimada nos estudos anteriormente citados, com apenas 2 famílias identificadas.

Entre 1982 e 2019 um total de 74.215.086 nascidos vivos foi registrado no Sistema de Informações sobre Nascidos Vivos (SINASC) do Banco de Dados do Sistema Único de Saúde (DATASUS). Josahkian *et al.*, (2020), neste período e com base no banco de dados do Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (SGM/HCPA), identificaram 1.652 casos, com uma incidência geral de 1,57 por 100.000 nascidos vivos. A incidência por 100.000 nascidos vivos para cada tipo de MPS foi estimada em: MPS I (0,29), MPS II (0,48), MPS IIIA (0,08), MPS IIIB (0,12), MPS IIIC (0,07), MPS IIID (0,001), MPS IVA (0,15), MPS IVB (0,003), MPS VI (0,35), MPS VII (0,02) e MPS IX (0). Na prevalência por região brasileira, a região Sudeste teve a maior prevalência com 47,6%, a região Norte teve a menor prevalência com 0,88%.

No Brasil, Federhen, *et al.* (2020) relataram uma frequência geral de 4,62 casos de MPS por 100.000 nascidos vivos e frequências isoladas para MPS I: 0,95; MPS II: 1,32; MPS III: 0,56; MPS IV: 0,57; MPS VI: 1,02; MPS VII: 0,05.

O perfil epidemiológico de MPS no Estado do Pará foi descrito por Castro *et al.* (2007). Dentre as MPS mais frequentemente diagnosticadas estão a MPS II e VI (1:960.005 por nascidos vivos), seguida da MPS I (1: 1.140.000 por nascidos vivos).

A maioria dos pacientes com MPS são assintomáticos ao nascimento, porém, na infância começam a apresentar os primeiros sinais e sintomas. A única exceção é a hidropsia fetal, comumente encontrada nos casos de MPS VII. Esta apresentação tardia dos sintomas contribui para o atraso do diagnóstico definitivo (MUENZER, 2004).

Em levantamento realizado por BORGES *et al.* (2020) com base em dados do *Exoma Aggregation Consortium* (ExAC) e do Banco de Dados de Agregação de Genomas (gnomAD) não relatando a MPSII, a prevalência máxima estimada variou de 0,46 por 100.000 para MPSIIID até 7,1 por 100.000 para MPS I, relatando uma prevalência geral estimada de todos os tipos de MPS superior ao relatado em outros estudos, como pode ser observado na figura 04.

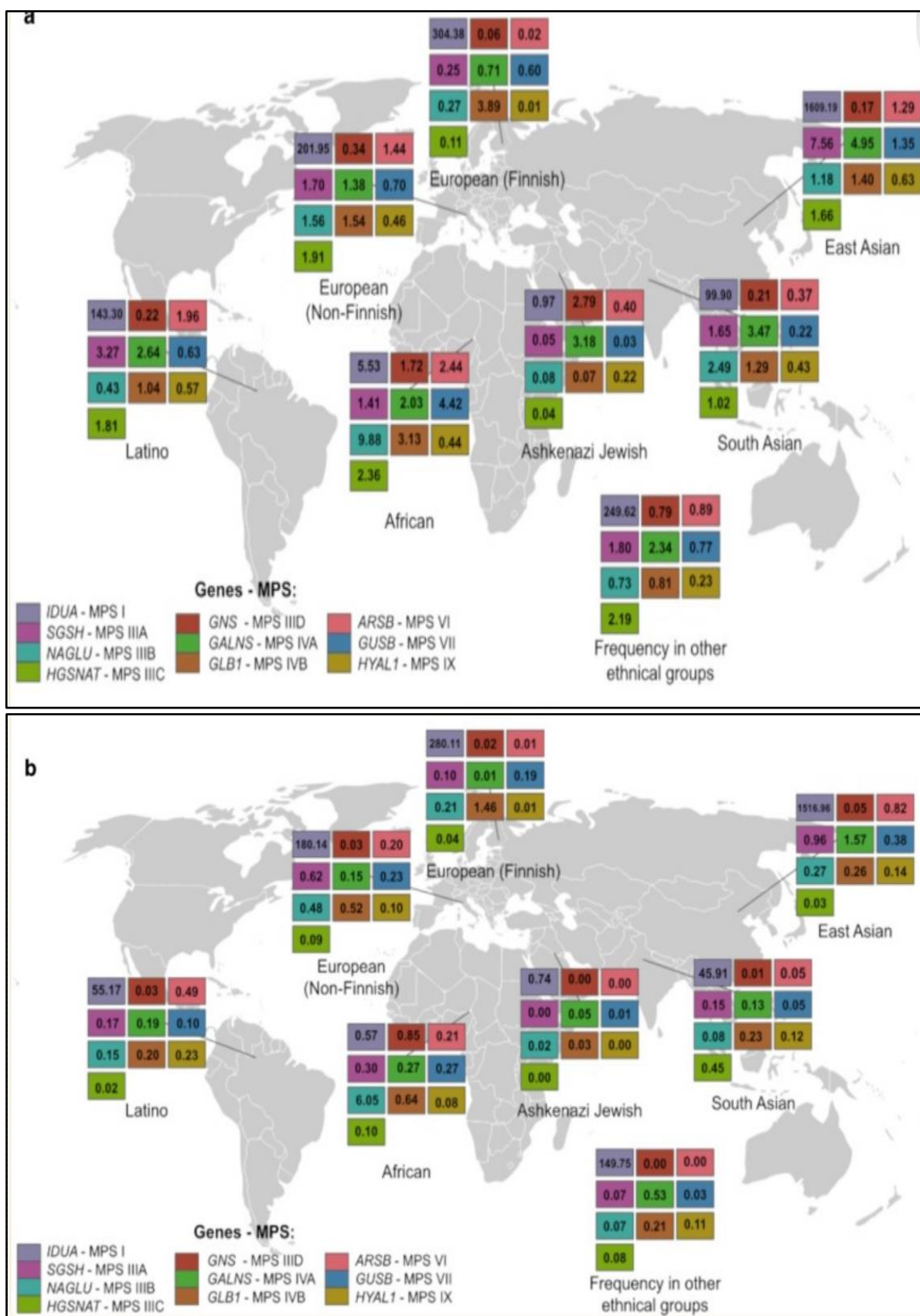


Figura 04 - Epidemiologia das MPS.

Fonte: Borges, *et al.*, (2020, p. 5). Prevalência máxima (a) e mínima (b) estimada dos tipos de MPS por 100.000 indivíduos em diferentes grupos étnicos. Dados para MPS II não incluídos.

1.3 Bases moleculares das MPS

Na década de 90, após a clonagem dos genes que codificam a maioria das enzimas relacionadas à catálise dos GAG, vários estudos foram realizados com o intuito de elucidar quais as principais variantes gênicas relacionadas às deficiências enzimáticas presentes em cada tipo de MPS. Apesar da variabilidade gênica apresentada pelos portadores de diferentes tipos de MPS, algumas mutações apresentam maior frequência de acordo com o tipo de MPS. Entretanto, algumas são relatadas predominantemente em determinadas regiões geográficas e/ou em populações específicas (ISOGAI *et al.*, 1998; VENTURI *et al.*, 2002; LIN *et al.*, 2008).

A seguir serão citadas as bases moleculares das MPS que serão abordadas no presente estudo.

1.3.1 Mucopolissacaridose I (MPS I) (Hurler, Hurler/Scheie e Scheie)

A MPS do Tipo I (OMIM: #607014) é uma DLD autossômica recessiva caracterizada pela deficiência da enzima alfa-L-iduronidase (IDUA; E.C. 3.2.1.76), responsável pela quebra dos GAG dermatan sulfato e heparan sulfato (KINGMA; JONCKHEERE, 2021). O gene que codifica a enzima IDUA está localizado na região p16.3 do cromossomo 4, contém 14 éxons e 13 íntrons, 19 kb de comprimento que codifica a proteína IDUA de 653 aminoácidos. A enzima IDUA apresenta peso molecular de 70.029 kDa (SCOTT *et al.*, 1990, Clarke *et al.*, 2019) (figura 05).

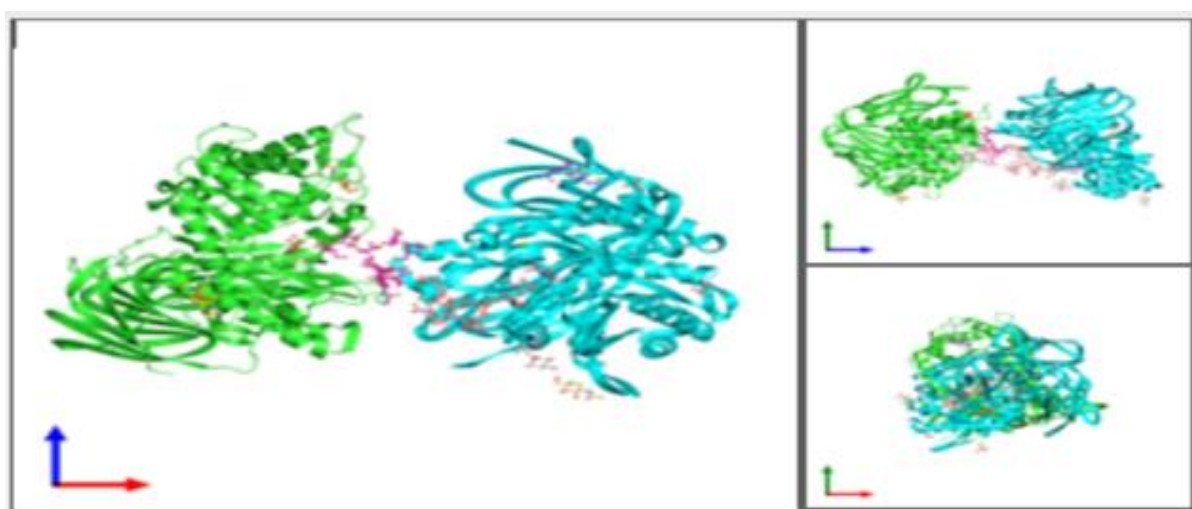


Figura 05 - Estrutura tridimensional da enzima alfa-L-iduronidase (IDUA).

Fonte: <https://www.ebi.ac.uk>

Os sintomas apresentados estão inseridos em um amplo espectro clínico, de caráter progressivo, que geralmente resultam na morte do indivíduo ainda na fase infantil, em função de diagnósticos tardios e/ou da ausência de um tratamento específico (KINGMA; JONCKHEERE, 2021).

A partir de critérios clínicos, pode-se distinguir diferentes padrões fenotípicos relacionados à essa doença, os quais são divididos em três subtipos: Hurler (forma leve), Hurler-Scheie (forma moderada) e Scheie (grave). Cada subtipo possui um padrão fenotípico distinto, com variações na taxa de excreção urinária de GAG, no nível de comprometimento ósseo e mental e na funcionalidade de alguns órgãos (HAMPE *et al.*, 2021).

Em relação às variantes patogênicas descritas no gene *IDUA*, Scott *et al.* (1992) mostraram a presença de algumas mutações frequentes em populações caucasianas como, por exemplo, p.W402X e p.Q70X e outra menos frequente como p.P533R. Essas mutações são responsáveis pela ausência da produção da enzima funcional e, conseqüentemente, pelo aparecimento de formas graves da doença. Outras mutações também foram descritas em pacientes com MPS I (mutações sem sentido, destruição do sítio de *splicing* e mudança na matriz de leitura), correlacionadas a diferentes quadros clínicos.

Yamagishi *et al.* (1996) verificaram que a maioria dos pacientes japoneses com MPS I apresentava a mutação p.R89Q, a qual também está presente em caucasianos e está relacionada a um fenótipo intermediário.

Matte *et al.*, (2003) descreveram 13 novas mutações em pacientes brasileiros, além das anteriormente descritas (p.W402X e p.Q70X). As mutações mais comuns encontradas em pacientes brasileiros foram a p.W402X (fenótipo grave) e a p.P533R (fenótipo intermediário), sendo que a primeira foi encontrada com a mesma frequência em populações ibero-americanas (60%) (GORT *et al.*, 1998), e a segunda foi, também, encontrada com a mesma frequência (10%) em populações italianas (GATTI *et al.*, 1997).

Clarke *et al.*, (2019) relataram associações entre genótipo-fenótipo em 538 pacientes com MPSI I. Neste estudo 380 pacientes apresentavam fenótipo grave (síndrome de Hurler) e 158 o fenótipo atenuado (síndrome de Hurler-Scheie ou Scheie). Cerca de 67,6% dos pacientes com fenótipo grave tinham genótipos nos quais ambas as mutações foram previstas para interromper gravemente a função da

IDUA. Os genótipos mais comuns em pacientes com fenótipo grave foram homozigose para W402X (28,7%), heterozigose composta para W402X e Q70X (16,1%) e homozigose para Q70X (6,3%). As mutações mais comuns entre os pacientes com fenótipo atenuado foram *missense* (71,8%), seguidas de *nonsense* (20,6%), pequenas deleções sem *frameshift* (3,2%) e intrônicas (2,8%). Apesar das correlações positivas entre genótipo e fenótipo, esse estudo também relatou um mesmo genótipo em fenótipos variáveis.

De acordo com dados do banco *Human Gene Mutation Database* (HGMD, 2023) foram relatadas 286 variantes no gene IDUA, sendo as mais frequentes *missense/nonsense* (57,3%) e 164 e intrônicas (15,3%). O fenótipo grave (síndrome de Hurler) foi a forma clínica de MPS I mais encontrada.

1.3.2 Mucopolissacaridose II (MPS II) (Síndrome de Hunter)

A Síndrome de Hunter ou MPS II (OMIM: #309900), corresponde a um tipo de DLD caracterizada pela deficiência da enzima iduronato-sulfatase (IDS; E.C. 3.1.6.13). É um EIM herdado com padrão de herança recessiva ligado ao cromossomo X, afetando cerca de 1:160.000 nascidos vivos do sexo masculino. A MPS II é muito semelhante aos quadros clínicos característicos da MPS I, com exceção do opacificação de córnea e do comprometimento progressivo do sistema nervoso central (NEUFELD; MUENZER, 2001, HASHIMOTO *et al.*, 2018; HAMPE, *et al.*, 2021).

O gene que codifica a enzima IDS está localizado na região q28 do cromossomo X, sendo composto por aproximadamente 24 kb, distribuídos por 9 éxons. O gene também possui um pseudogene que compreende cópias dos éxons 2 e 3 e do íntron 7, localizado 20kb distante da região codificante do gene IDS (TIMMS *et al.*, 1995; FROISSART *et al.*, 2007).

Aproximadamente 637 variantes patogênicas foram descritas no gene IDS, sendo a maioria *missense* / *nonsense* ou pequenas deleções (HGMD, 2023). Grandes deleções e rearranjos ocorrem em aproximadamente 20% dos pacientes. Dentre as mutações mais comuns, estão as deleções parciais ou totais do gene e substituições de somente uma base. A escassez de mutações comuns e recorrentes no gene IDS dificulta as correlações genótipo/fenótipo. Deleções completas e rearranjos complexos do gene IDS frequentemente resultam em um fenótipo grave

(SUKUEGAWA *et al.*, 2006; FROISSART *et al.*, 2007; MARTIN *et al.*, 2008; MUENZER *et al.*, 2009).

A molécula de DNA produzida pelo gene IDS contém aproximadamente 2,3 kb. Este gene codifica um polipeptídeo de 550 aminoácidos, incluindo um peptídeo sinal de 25 aminoácidos. Os precursores de 76 kDa e 90 kDa da enzima IDS, após vários processos pós-transcricionais como glicosilação, fosforilação e proteólise são convertidas a várias formas intermediárias que são, por fim, transformados em proteínas maduras de 55 kDa e 45 kDa (figura 06) (FROISSART *et al.*, 1995).

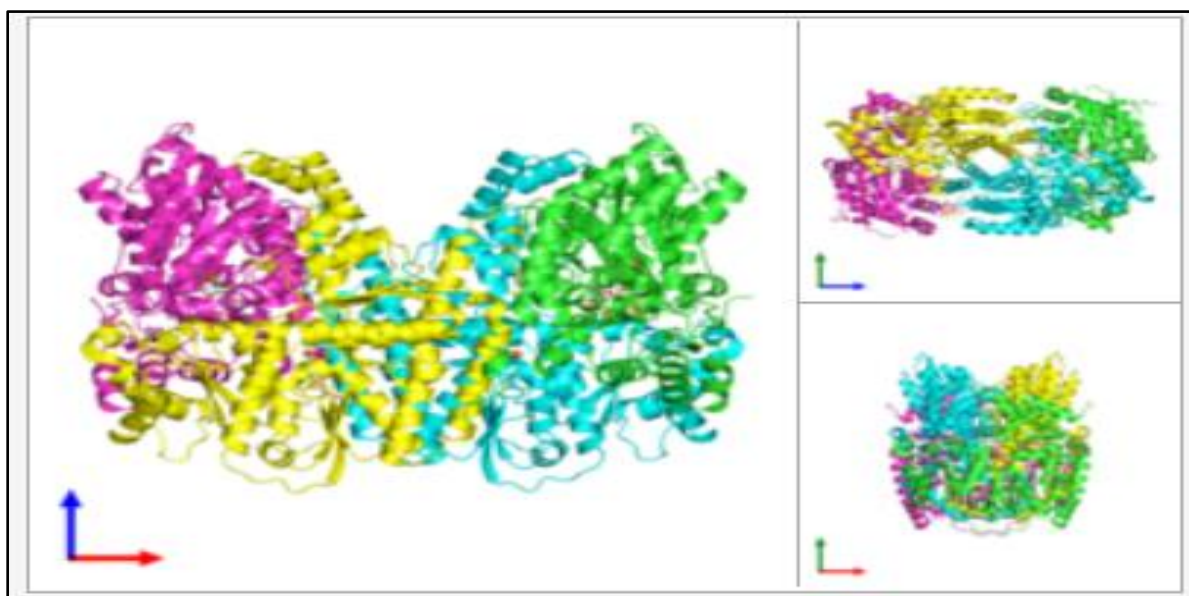


Figura 06 - Estrutura tridimensional da enzima humana. **Fonte:** <https://www.ebi.ac.uk>

Apesar da ampla heterogeneidade molecular relacionada ao gene IDS, algumas variantes foram descritas como mais frequentes em algumas populações. Isogai *et al.* (1998) verificaram em pacientes japoneses uma elevada prevalência de algumas mutações, concentradas nos éxons 5 e 9, além de mutações no sítio de *splicing* do éxon 3 e mutações intrônicas, as quais estão relacionadas a um fenótipo grave da doença.

Alves *et al.* (2006) estudaram a frequência de mutações do gene IDS em pacientes portugueses e verificaram que a maioria das variantes corresponde a alterações no sítio de *splicing*, ocasionadas tanto por substituições intrônicas quanto exônicas, principalmente aquelas que ocorrem no éxon 3.

Filocamo *et al.* (2001) descreveram elevada frequência de mutações do tipo *missense* (55,2%), *nonsense* (20,7%), e pequenas deleções ou mutações em sítios de *splicing* em pacientes italianos. A maioria das pequenas deleções encontradas

ocorreu em regiões do gene muito susceptível à ocorrência de alterações gênicas (éxons 3, 8 e 9). Ainda segundo o autor, o estabelecimento de uma correlação do genótipo - fenótipo em pacientes com MPS II é muito difícil, haja vista a grande quantidade de variantes presentes no gene IDS e a falta de uma classificação dos pacientes em relação às diferentes apresentações clínicas.

1.3.3 Mucopolissacaridose III (síndrome de Sanfilippo)

A Mucopolissacaridose tipo III (MPS III), também conhecida como síndrome de Sanfilippo, divide-se em quatro subtipos: MPS IIIA, IIIB, IIIC e IIID decorrentes da falta parcial ou total de heparan-N-sulfatase (SGHS), α -N-acetilglucosaminidase (NAGLU), Heparan sulfato acetil-CoA: α -glucosaminide N-acetiltransferase (HGSNAT) e N-acetilglucosamina 6-sulfatase (GNS), respectivamente, levando ao comprometimento da degradação do HS (KHAN AS, *et al.*, 2017).

Os pacientes com MPS III são assintomáticos ao nascimento, frequentemente apresentam dificuldades de aprendizagem, comportamento agressivo, hiperativo e distúrbios do sono, evoluindo para uma regressão mental progressiva, incluindo deficiência intelectual, deterioração sensório-motora e o início de convulsões gerais e localizadas (MALM; MANSSON, 2010).

A MPS III é um EIM caracterizado por deterioração neurológica progressiva, anormalidades comportamentais, fenótipo somático relativamente leve e mortalidade precoce. Apresenta uma grande variabilidade clínica na intensidade dos sintomas apresentados, que começam a se manifestar durante a primeira infância (FEDELE, 2015).

Devido à escassez de manifestações somáticas e à raridade da doença, o diagnóstico precoce torna-se difícil. A terapia que visa a fisiopatologia da doença subjacente pode oferecer o maior benefício clínico quando iniciado antes do início de sequelas neurológicas significativas (BODAMER, 2014).

a) MPS IIIA

A MPS-IIIA apresenta herança autossômica recessiva e é causada por variantes patogênicas no gene *SGSH*. Este gene codifica a enzima N-sulfoglucosamina sulfohidrolase (SGSH) composta por 463 resíduos de aminoácidos e que está envolvida na degradação de HS (fig. 7). A MPS IIIA (OMIM: #252900)

parece ser a forma mais grave, com rápida progressão dos sintomas e baixa expectativa de vida (VAN DE KAMP *et al.*, 1981; YOGALINGAM *et al.*, 2000). A MPS III-A é causada pela presença de cerca de 148 variantes patogênicas no gene SGSH, sendo a maioria *nonsense* (76,4%) (HGMD, 2023).

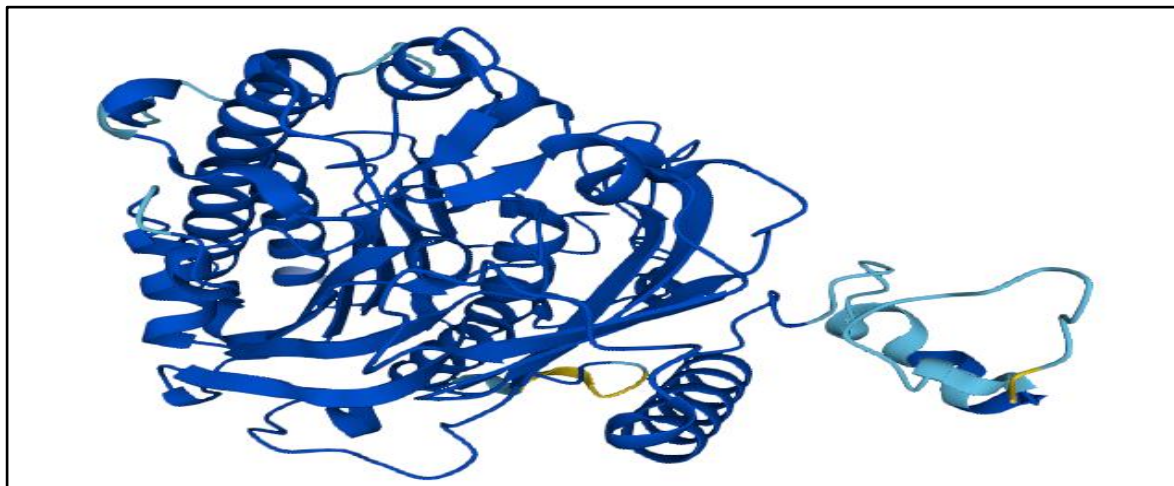


Figura 07 - Estrutura representativa da enzima SGSH.

Fonte: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/A0A0P7YQP6/entry>

A MPS III apresenta neuro-degeneração grave característica, como atraso progressivo do desenvolvimento e declínio cognitivo, para os quais não há tratamento atualmente. Tem sido proposto um tratamento das lesões do sistema nervoso central (SNC), baseado em pequenas moléculas capazes de atingi-lo, e que pode representar um avanço relevante para a terapia medicamentosa desta forma de MPS III (LANGFORD-SMITH *et al.*, 2012; SORRENTINO; FRALDI, 2016; CAPUOZZO *et al.*, 2022).

Muitos avanços foram feitos no desenvolvimento de novas terapias para o envolvimento cerebral desta patologia em modelos de camundongos e cães que recapitulam as características neuropatológicas da MPS-III A. Essas abordagens são geralmente baseadas em vias de administração direta no SNC através das quais as moléculas terapêuticas acessam o SNC via parênquima (injeções intracerebrais) ou via líquido cefalorraquidiano (injeções intraventriculares/intratecais), que são altamente invasivas e pouco adequadas para uso clínico (BEARD *et al.*, 2015; SORRENTINO; FRALDI, 2016; KING *et al.*, 2017).

Estudos de CAPUOZZO *et al.*, (2022), relatam o desenvolvimento de tratamentos baseados em pequenas moléculas capazes de atingir o SNC que podem ser um avanço relevante para a terapia. O estudo identificou a fluoxetina como um

promissor inibidor seletivo da recaptação da serotonina. A fluoxetina aumenta a exocitose lisossômica em fibroblastos embrionários de camundongos, sugerindo que esse processo pode ser responsável pela depuração do heparan sulfato, melhorando a patologia somática e cerebral em um modelo de camundongo de MPS-IIIA, diminuindo o acúmulo de GAG e substratos autofágicos agregados, reduzindo a inflamação e retardando a deterioração cognitiva.

b) MPS III-B

A Síndrome de Sanfilippo B ou MPS IIIB (OMIM: #252920) é uma doença causada pela deficiência da enzima α -N-acetil-glicosaminidase, responsável pela degradação do GAG HS (NEUFELD; MUENZER, 2001). O gene que codifica a enzima NAGLU (fig.08) está localizado na região q21 do cromossomo 17, contém aproximadamente 8,5 kb, dividido em 6 éxons. O gene NAGLU contém 2.575 pb e codifica a proteína NAGLU com 743 aminoácidos. Esta enzima apresenta peptídeo sinal de 20 a 23 aminoácidos imediatamente antes da porção amino terminal e seis possíveis pontos de glicosilação (WEBER *et al.*, 1996).

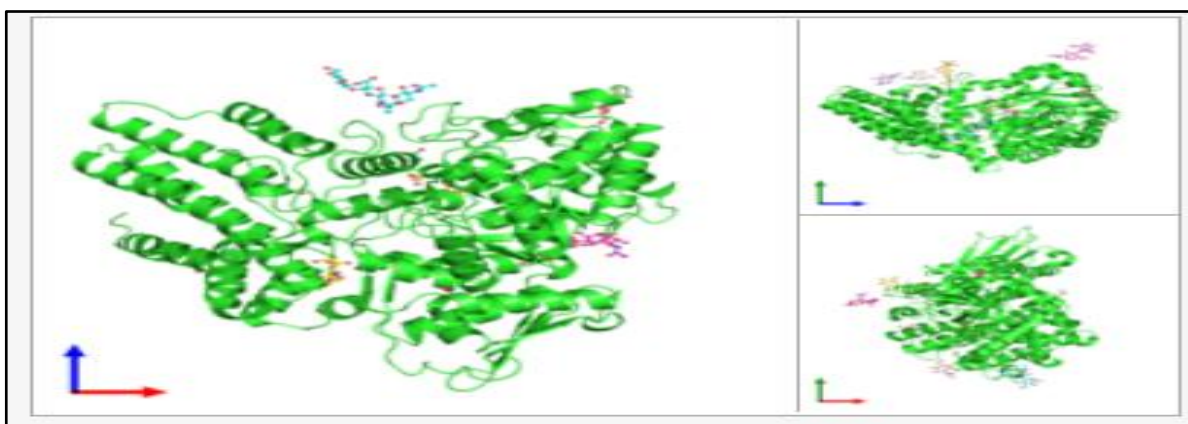


Figura 08 - Estrutura representativa da enzima NAGLU humana. **Fonte:** <https://www.ebi.ac.uk>

Os principais sintomas clínicos apresentados são comportamento agressivo, hiperatividade seguida de deficiência mental progressiva. Além disso, outros sintomas também estão presentes em pacientes com MPS IIIB, tais como hirsutismo, hepatoesplenomegalia moderada, hipertricrose e atraso no desenvolvimento, com possível comprometimento do SNC em pacientes com quadros avançados da doença (CLEARY; WRAITH, 1993; NEUFELD; MUENZER, 2001; CHINEN *et al.*, 2005).

Dados da HGMD (2023) relatam 171 diferentes mutações associadas ao gene NAGLU, sendo 117 *nonsense*, 6 *Splicing*, 26 pequenas deleções, 14 pequenas

inserções, 1 pequeno *indels*, 4 duplicações e 3 inserções / duplicações. De acordo com Weber *et al.* (1996), esta variabilidade de mutações pode estar relacionada à ampla heterogeneidade do fenótipo clínico apresentado pelos pacientes com MPS IIIB.

Beesley *et al.*, (1998) amplificaram as regiões codificantes do gene NAGLU com o objetivo de encontrar alterações genéticas em pacientes europeus com MPS IIIB. Das 16 mutações encontradas, 3 estavam presentes em mais de um paciente (p.Y140C, p. R297X e p. R626X) e, juntas, corresponderam a 25% dos alelos mutantes analisados.

Tanaka *et al.*, (2002) realizaram uma triagem molecular em pacientes japoneses para investigar mutações no gene NAGLU. De acordo com o estudo, foram encontradas duas novas mutações (p.F314L e p.V241M), as quais foram relacionadas a fenótipos moderados da doença, e a mutação p.R565P correlacionada a um fenótipo grave, como comprovado também nos estudos de Chinen *et al.*, (2005).

As mutações patogênicas observadas com maior frequência nos estudos são as mutações missense p.F48L, p.G69S, p.S612G e p.R643C que estão associadas a um fenótipo clínico de início tardio (ZHAO *et al.*, 1998; YOGALINGAM; HOPWOOD, 2001)

c) MPS IIIC

Na Sanfilippo C ou MPS IIIC (OMM: # 252930), a enzima deficiente é uma acetiltransferase que catalisa a conversão de resíduos de alfa-glucosaminida em N-acetilglucosaminídeos na presença de acetil-CoA (KLEIN, 1981).

A MPS IIIC ocorre devido à deficiência da enzima Acetil-CoA:a-glicosamina acetiltransferase (HGSNAT) (figura 09). Esta enzima, localizada na membrana lisossomal, catalisa a acetilação transmembranar do resíduo terminal da glucosamina do HS. O gene *HGSNAT* foi identificado na região p11.1 do cromossomo 8 e contém 18 exons. O cDNA codifica um polipeptídeo de 663 aminoácidos, que contém onze domínios transmembrana, cinco sítios de glicosilação, massa molecular de 73293 KDa e estrutura quaternária na forma de um homoligômero (KLEIN *et al.*, 1981; FAN *et al.*, 2006; www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=HGSNAT, 2022).

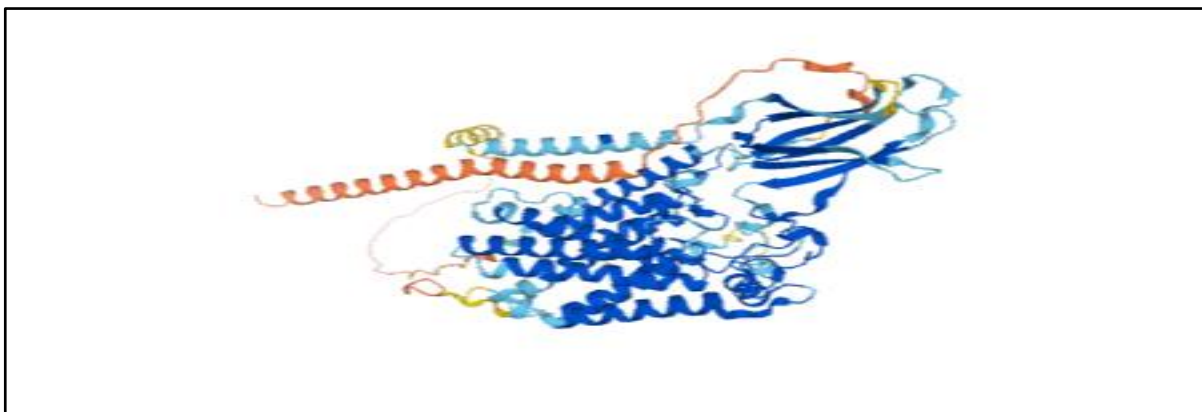


Figura 09 - Estrutura tridimensional da enzima HGSNAT humana.
Fonte: <https://alphafold.ebi.ac.uk/entry/Q68CP4>

Fan *et al.* (2006) identificaram o gene *HGSNAT*, codificando a N-acetiltransferase e identificaram 2 mutações que representam 4 alelos em 2 linhas de células humanas com MPS IIIC: 01 mutação de junção (3 alelos mutantes) e 01 inserção de par de base única (1 alelo mutante). Hrebicek *et al.* (2006) também identificaram variantes patogênicas no gene *HGSNAT* em 30 pacientes com MPS IIIC, identificaram 04 variantes sem sentido, 03 deleções, 01 duplicação, 06 mutações intrônicas e 14 mutações *missense*. Canals *et al.* (2011) relataram 09 mutações patogênicas diferentes no gene *HGSNAT*, incluindo 7 novas mutações, em 11 pacientes. Os ensaios de expressão funcional *in vitro* em células COS-7 mostraram que as variantes produziram proteínas sem atividade enzimática residual. Dados recentes apontam 77 mutações para o gene *HGSNAT* (ZELEI *et al.*, 2018).

1.3.4 Mucopolissacaridose IV (MPS IV)

A MPS IV, também conhecida como síndrome de Morquio, é um distúrbio autossômico recessivo de armazenamento lisossômico. Esta síndrome divide-se em 2 subtipos: MPS IVA (OMIM #253000), causada pela deficiência da enzima deficiente N-acetilgalactosamina-6-sulfato sulfatase (GALNS) e MPS IVB (OMIM #253010), causada pela deficiência da enzima beta-galactosidase (GLB 1) (TOMATSU. *et al.*, 2012). Nosso estudo contempla o subtipo A:

- a) Mucopolissacaridose IV A (MPS IV A) (síndrome de Morquio);

A MPS IVA (OMIM #253000), também conhecida como síndrome de Morquio A, é uma DLD autossômica recessiva causada por variantes patogênicas no gene *GALNS*. Os genótipos podem se apresentar na forma de homozigose recessivo ou

heterozigose composta. Este gene codifica a enzima galactosamina-6-sulfato sulfatase, que degrada os GAG específicos QS e condroitina-6-sulfato (C6S). O gene *GALNS* está localizado na região q24.3 do cromossomo 16, seu cDNA compreende 1566 pb, contém 14 éxons e 13 íntrons, medindo aproximadamente 50 kb de comprimento. O gene *GALNS* codifica os 522 aminoácidos da proteína GALNS com o peptídeo sinal de 26 aminoácidos (TOMATSU *et al.*, 1996; NAKASHIMA *et al.*, 1994; PERACHA *et al.*, 2018).

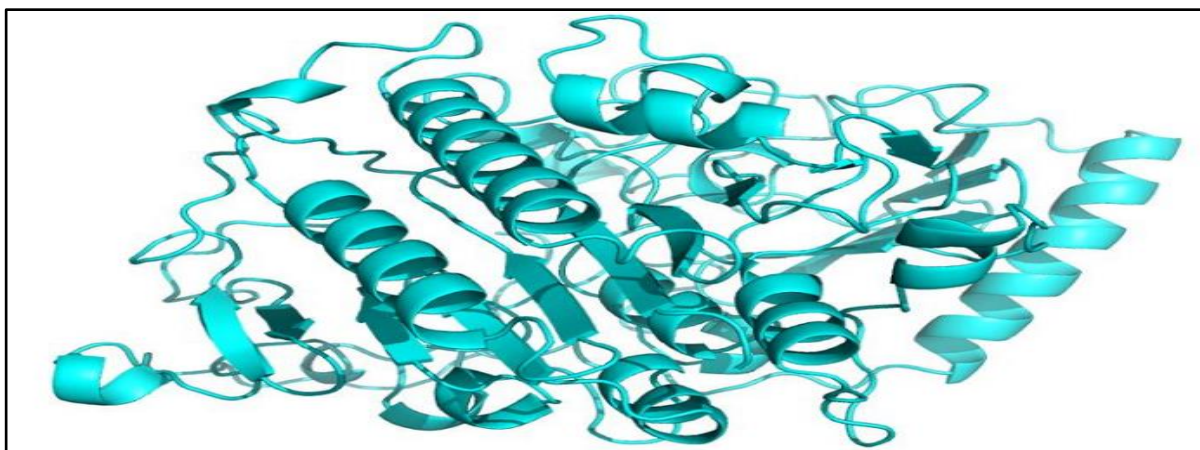


Figura 10 - Estrutura representativa da enzima GALNS. **Fonte:** Torrieri, 2015.

De acordo com o banco de dados do HGMD (2023), foram descritas 354 mutações no gene *GALNS*. Tomatsu *et al.* (1992) identificaram no gene *GALNS* 4 mutações diferentes em pacientes com MPS IVA. Tomatsu *et al.* (1996) também identificaram 2 deleções separadas de quase 8.0 e 6.0 kb neste gene.

Bunge *et al.* (1997) identificaram 35 variantes no gene *GALNS* em 33 famílias (35 pacientes com MPS IVA), principalmente de origem europeia. A maioria das alterações genéticas é representada por mutações de ponto: 23 missense, 2 nonsense e 3 afetando sítios de *splicing*. Foram detectadas também seis pequenas deleções (1 a 27 pb) e 1 inserção.

Estudos demonstraram através da análise de expressão transitória, e com base no modelo estrutural terciário da proteína GALNS humana, associações de mutações pontuais correlacionadas com fenótipos clínicos (figura 11). Sugerindo que existem pelo menos três razões diferentes para o fenótipo grave: destruição do núcleo hidrofóbico ou modificação do empacotamento; remoção de uma ponte salina para desestabilizar toda a conformação; modificação do sítio ativo. Já as mutações

localizadas na superfície da proteína GALNS apresentam um fenótipo atenuado (SUKEGAWA *et al.*, 2000; TOMATSU *et al.*, 2005).

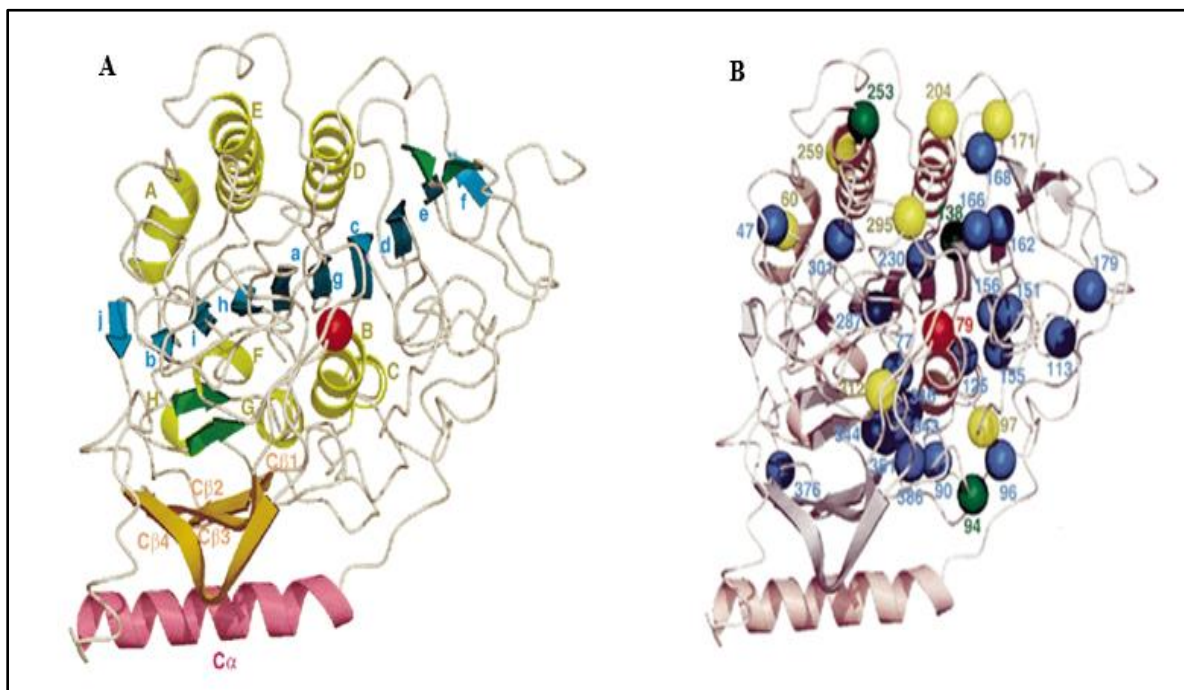


Figura 11 - Modelo terciário da proteína GALNS humano.

Fonte: <https://doi.org/10.1093/hmg/9.9.1283>. **(A)** O maior domínio N-terminal está na parte superior e o menor domínio C-terminal está na parte inferior. O resíduo modificado, C79, no sítio ativo é mostrado por uma esfera vermelha. **(B)** As esferas azuis, verdes e amarelas e os números de aminoácidos representam os resíduos mutados (azul, fenótipo grave; verde, fenótipo intermediário; amarelo, fenótipo leve).

Caciotti *et al.* (2015), investigando variantes patogênicas no gene *GALNS* em 37 pacientes italianos, falharam em caracterizar a segunda mutação causadora da doença em 16% dos pacientes. Para corrigir esta falha, análises moleculares, quantitativas fluorescentes-PCRs (QF-PCRs) e hibridização genômica comparativa (CGH) foram úteis para identificar 16 novas variantes no gene *GALNS*: duas grandes deleções e seus pontos de interrupção correspondentes e 14 mutações pontuais.

1.3.5 Mucopolissacaridose VI (MPS VI) (síndrome de Maroteaux-Lamy)

A Síndrome de Maroteaux-Lamy, ou MPS VI (OMIM: #253200), corresponde a uma DLD cuja principal característica é a ausência total ou parcial da enzima arilsulfatase B (ARSB; EC. 3.1.6.12) nos tecidos e órgãos. Inicialmente, descrita em 1963 como uma síndrome semelhante à Síndrome de Hurler (MPS I), porém com

menor frequência de alterações do desenvolvimento intelectual. A MPS VI possui como principais sintomas hérnias umbilicais e inguinais, atraso no desenvolvimento somático, deformidades ósseas (disostose múltipla), hipertricose, comprometimento de nervos periféricos (Síndrome do túnel do carpo), opacidade da córnea e hepatoesplenomegalia (SCRIVER *et al.*, 2001; SIDDHARTH *et al.*, 2004).

O gene *ARSB* está localizado na região 5q11-q13, possui 533 aminoácidos e 8 exons. Este gene codifica a ARSB (N-acetilgalactosamina 4-sulfatase) (figura 12), uma enzima lisossômica que remove o grupo éster sulfato C4 do resíduo de açúcar N-acetilgalactosamina no terminal não redutor dos glicosaminoglicanos (GAG) dermatan sulfato e condroitin sulfato durante a degradação lisossômica, estudos demonstram uma correlação entre a quantidade de GAG e o fenótipo (KARAGEORGOS *et al.*, 2007).

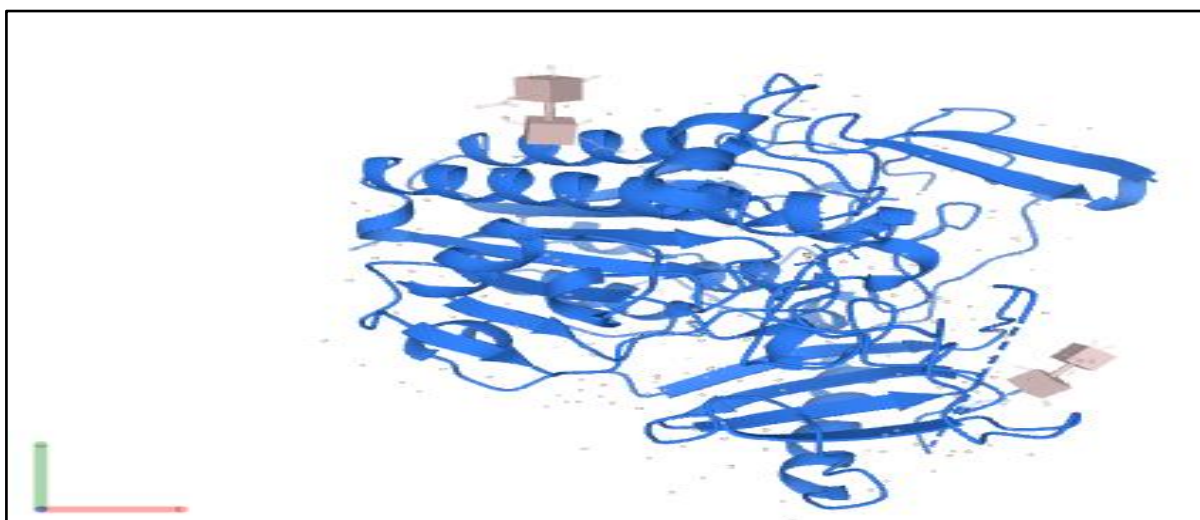


Figura 12 - Estrutura representativa da enzima ARSB. **Fonte:** <https://www.ebi.ac.uk>

Mutações em homozigose desse gene promovem as formas mais graves da doença. As mutações mais frequentes costumam ocorrer nas regiões correspondentes aos éxons 4 e 5, (KARAGEORGOS *et al.*, 2007).

A ampla heterogeneidade de variantes no gene *ARSB* em pacientes e a apresentação de correlação de algumas variantes e a intensidade e amplitude da apresentação fenotípica foram descritas nos trabalhos de Litjens *et al.*, (1996), Villani *et al.*, (1998), Petry *et al.*, (2005) e Garrido *et al.*, (2007).

Garrido *et al.*, (2007) identificaram uma troca de G-C no íntron 5 do gene *ARSB* (1143-1G-C) em 21,9% dos alelos mutantes de 16 pacientes espanhóis e

argentinos. Através de RT-PCR observaram que a mutação resultou no salto do exon 6 e em seu término prematuro. A análise de haplótipos indicou um efeito fundador.

Tomanin *et al.*, (2018) revisaram as variantes do gene *ARSB* publicadas na literatura e em bancos de dados públicos e identificaram 908 alelos com 198 variantes não polimórficas distintas em 478 pacientes. Três variantes benignas que haviam sido incorretamente relatadas como patogênicas também foram relatadas. A maioria (59,5%) das variantes únicas era missense, seguidas por pequenas deleções (13,5%), nonsense (12,0%), lintrônicas (5,0%), pequenas duplicações (3,0%) e grandes deleções (3,0%). Dos pacientes identificados, 54,8% eram homozigotos para variantes patogênicas no gene *ARSB*, 35,6% eram heterozigotos, 9,2% tinham apenas um alelo relatado e 0,4% tinham ambos os alelos não identificados. As variantes patogênicas não parecem estar concentradas em nenhuma região particular da proteína. A análise da correlação genótipo-fenótipo baseada em homozigotos foi pouco informativa para a maioria das variantes, embora algumas variantes parecessem estar associadas a um fenótipo progressivo mais rápido. Este trabalho enfatiza a importância de submeter novas variantes a bancos de dados públicos.

Até 2023 o banco de dados *Human Gene Mutation Database* relatou 201 mutações para este gene em sua maioria mutações missense/nonsense (HGMD, 2023).

1.3.6 MPS VII (Síndrome de Sly)

A mucopolissacaridose VII, também denominada de síndrome de Sly (OMIM#253220), é uma doença de armazenamento lisossomal autossômica recessiva, caracterizada pela incapacidade de degradar GAG contendo ácido glicurônico devido a deficiência da enzima lisossomal beta-glicuronidase (GUSB: β -D-glucuronosídeo glucuronosohidrolase) (figura 13), causando acúmulo de sulfato de dermatan, sulfato de heparan e 4-6-sulfato de condroitina nos tecidos (SHIPLEY *et al.*, 1993).

O gene *GUSB* abrange 20 kb e está localizado na região q11.21–7q11.22 do cromossoma 7 e contém 12 éxons. A MPS VII é uma doença rara com apenas 58 variantes relatadas. Os dados epidemiológicos da MPS VII são escassos, porém estima-se que a prevalência de nascimentos aproximada seja de 0,02 a 1,14 para

cada 100.000 nascidos vivos (KHAN et al., 2017; BORGES *et al.*, 2020; CELIK *et al.*, 2021).

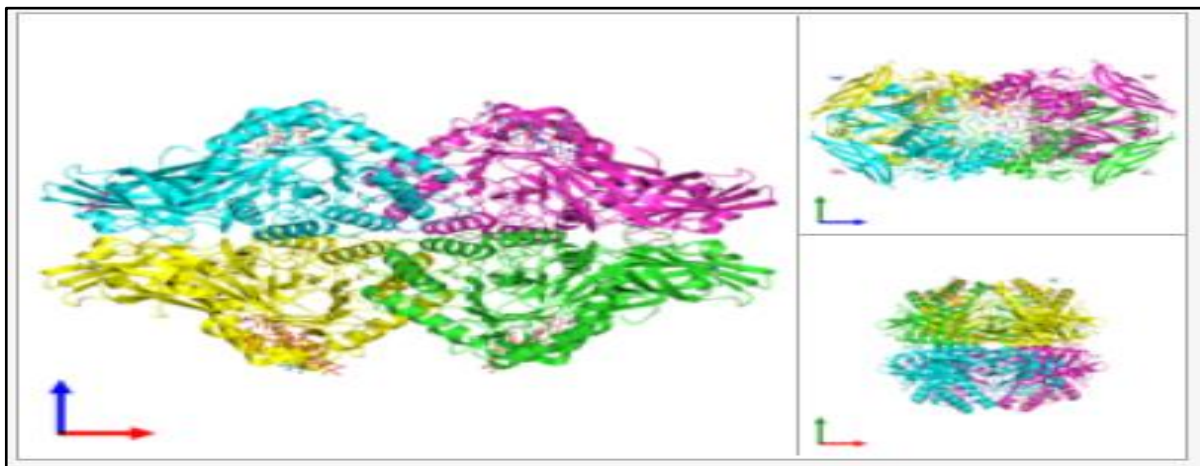


Figura 13 - Estrutura representativa da Beta-glucuronidase humana. **Fonte:** <https://www.ebi.ac.uk/>

O fenótipo é altamente variável, variando de hidropisia fetal letal grave a formas leves com sobrevivência até a idade adulta. A maioria dos pacientes com o fenótipo intermediário apresenta hepatomegalia, anomalias esqueléticas, face grosseira e graus variáveis de deficiência mental (SHIPLEY *et al.*, 1993; KHAN, *et al.*, 2017).

Os estudos de Giugliani *et al.* (2021) relataram 13 pacientes vivos de um total de 27 casos brasileiros da MPS VII diagnosticados de 1982 a 2019. Os resultados apontam que 12 de 13 pacientes do estudo são homozigotos para a mutação c.526C>T (p.Leu176Phe). Uma nova variante do gene *GUSB* foi encontrada: c.875T>C (p.Leu292Pro) em um heterozigoto composto com a variante c.526C>T (p.Leu176Phe).

No gene *GUSB* foram identificadas em torno de 68 variantes patogênicas, missense/nonsense 56, 5 Splicing, 5 pequena deleções, 1 regulatória e 1 exclusão bruta (HGMD, 2023).

1.4 Fenótipos clínicos das MPS

Reconhecer um paciente nos estágios iniciais das MPS antes que danos irreversíveis se desenvolvam, é um grande desafio para os profissionais de saúde. Mesmo que com frequência pacientes com MPS apresentem sinais específicos que

são altamente sugestivos do diagnóstico, a identificação tardia da doença ainda é uma realidade (CHEN *et al.*, 2016, KUIPER *et al.*, 2018).

Há muito se sabe que as MPS compartilham algumas sintomatologias e outras nos direcionam para a síndrome mais provável. Por exemplo a deficiência mental profunda é característica da MPS I H (Síndrome de Hurler), da forma grave da MPS II e de todos os tipos de MPS III. As MPS VI e MPS II (forma moderada) não apresentam, geralmente, comprometimento mental. Problemas ósseos são mais comumente descritos na MPS IV (NEUFELD & MUENZER, 2001; MUENZER, 2004).

Além de na maioria dos casos os pacientes começarem a apresentar sintomas somente nos primeiros anos de vida, alguns pacientes com fenótipos atenuados de MPS provavelmente consultarão reumatologistas e ortopedistas antes de serem diagnosticado, devido a várias manifestações osteoarticulares, incluindo rigidez articular e síndrome do túnel do carpo (BRUNI *et al.*, 2016)

Apesar de apresentarem, em comum, características crônicas e progressivas, os sintomas observados nos pacientes com MPS variam de acordo com o tipo e genótipo identificados. Podendo apresentar, em gravidade variada, vários sintomas multissistêmicos, tais como complicações neurológicas progressivas, distúrbios oftalmológicos, perda auditiva, problemas gastrointestinais e hepatobiliares, problemas cardiovasculares e respiratórios, anormalidades ósseas e articulares, nanismo e características faciais grosseiras, diminuição de mobilidade, e anormalidades renais e hematopoiéticas incomuns nas MPS, porém relatado na MPSPS (MUENZER, 2004; SOFRONOVA, *et al.*, 2022).

Sem um programa de triagem neonatal que contemple as DLD, é um grande desafio para os profissionais da saúde reconhecerem um paciente com MPS nos estágios iniciais da doença, evitando que danos irreversíveis se manifestem. Em muitos casos, pacientes com MPS e outras DLD podem apresentar sinais específicos altamente sugestivos do diagnóstico. No entanto, o que observamos é uma média mundial de diagnósticos tardios (KUIPER *et al.*, 2018).

Observa-se que como boa parte da sintomatologia não é exclusiva das MPS é improvável que pacientes que apresentem manifestações isoladas sejam diagnosticados com MPS se não estiverem sob um programa de triagem seletiva e/ou triagem simultânea para vários distúrbios com sinais e sintomas sobrepostos.

Baseado nos estudos de Kubaski *et al.*, (2020), o quadro 02 aponta os principais sintomas das MPS.

Quadro 02 - Sinais e sintomas que devem levantar suspeita clínica de MPS.

Sinal / sintoma de MPS		Tipos MPS							
		I	II	III	IV	VI	VII	IX	MPSPS
Cabeça e pescoço	Características faciais grosseiras	+	+	+	+	+	+		+
	Hipertricose / cabelo grosso no couro cabeludo	+	+	+		+	+		+
	Perda de audição	+	+	+	+	+	+		+
	Macrocefalia / escafocefalia	+	+	+		+	+		
	Nublado da córnea	+			+	+	+		
	Dentição anormal	+	+	+	+	+	+		
	Sela túrcica em forma de J	+	+			+	+		+
Osteoarticular	Baixa estatura	+	+		+	+	+		+
	Rigidez articular	+	+	+		+	+	+	+
	Displasia do quadril	+	+	+		+	+	+	
	Cifose toracolombar	+	+		+	+	+		+
	Genu Valgum	+	+		+	+	+		
	Displasia odontóide	+	+		+	+			
	Mãos em garra	+	+			+	+		+
	Falanges em forma de bala	+	+			+	+		+
	Síndrome do túnel carpal	+	+			+			
Cardiovascular	Frouxidão articular				+				
	Espessamento / disfunção da válvula	+	+	+	+	+	+		
Neurológico	Hipertrofia ventricular esquerda	+	+	+	+	+	+		+
	Atraso de desenvolvimento / deficiência intelectual	+	+	+			+		+
	Ventriculomegalia	+	+	+		+	+		
	Espaços perivascularares dilatados	+	+	+		+			
Avias aéreas	Comportamento hiperativo / agressivo		+	+					
	Infeções respiratórias recorrentes	+	+	+	+	+	+		+
	Doença obstrutiva das vias aéreas	+	+		+	+	+		+
Abdômen	Hepatomegalia / esplenomegalia	+	+	+		+	+		
	Hérnia umbilical / inguinal	+	+	+			+		
Outros	Granulação anormal em leucócitos	+	+	+	+	+	+		+
	Hidropisia fetal	+			+		+		
	Proteinúria								+
	Citopenias								+

Fonte: (KUBASKI *et al.*, 2020).

Visando de ilustrar as manifestações clínicas das MPS de forma didática, as figuras 14 (a, b e c) apontam os principais fenótipos a serem observados como um sinal de alerta para possíveis casos de MPS.

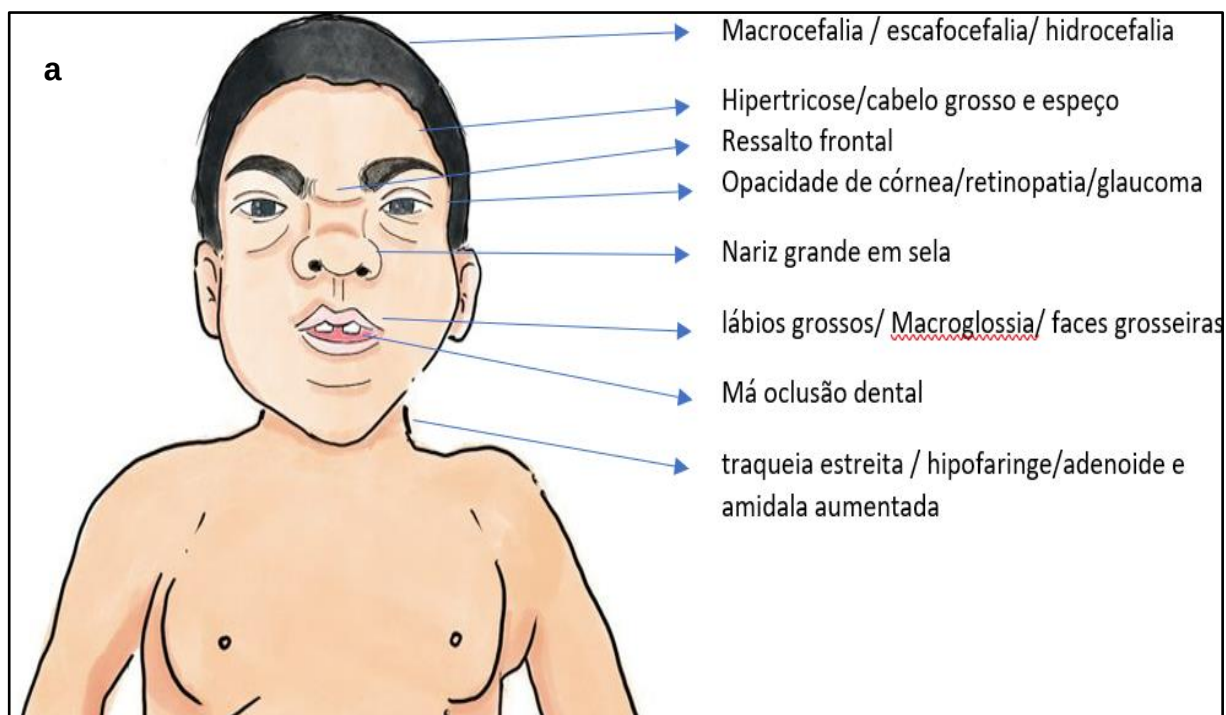
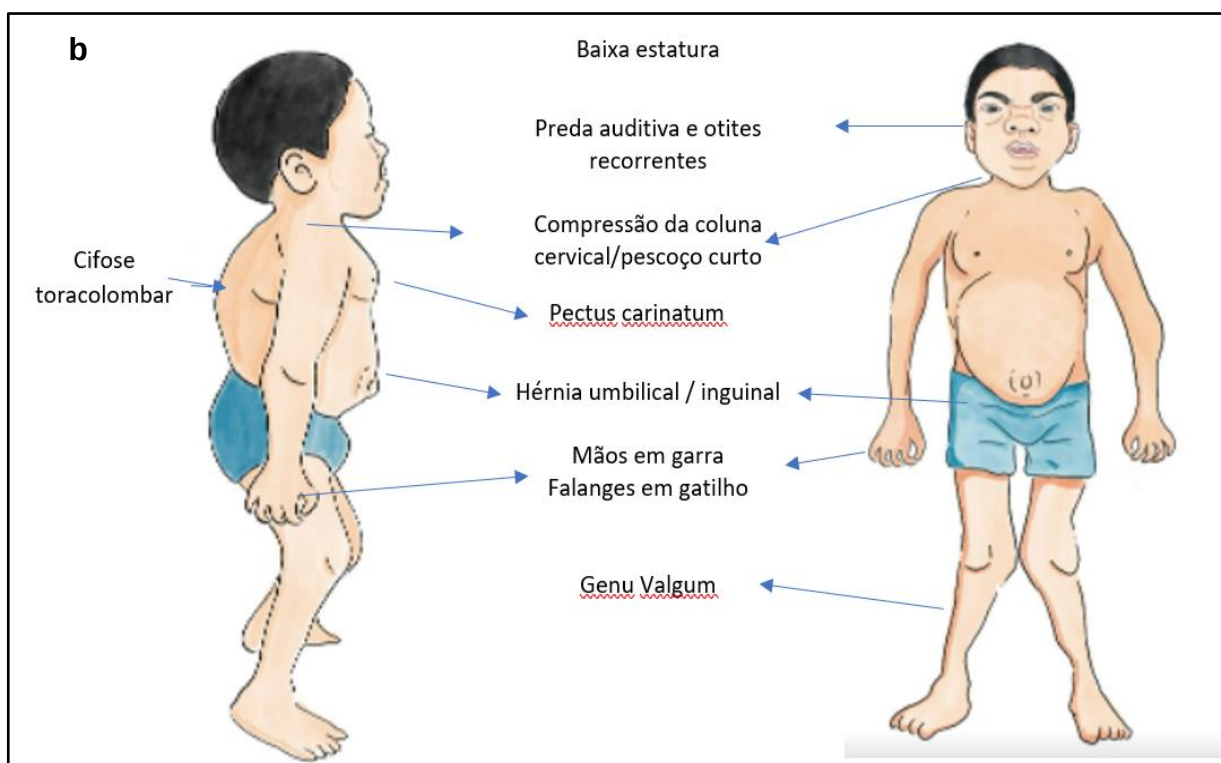
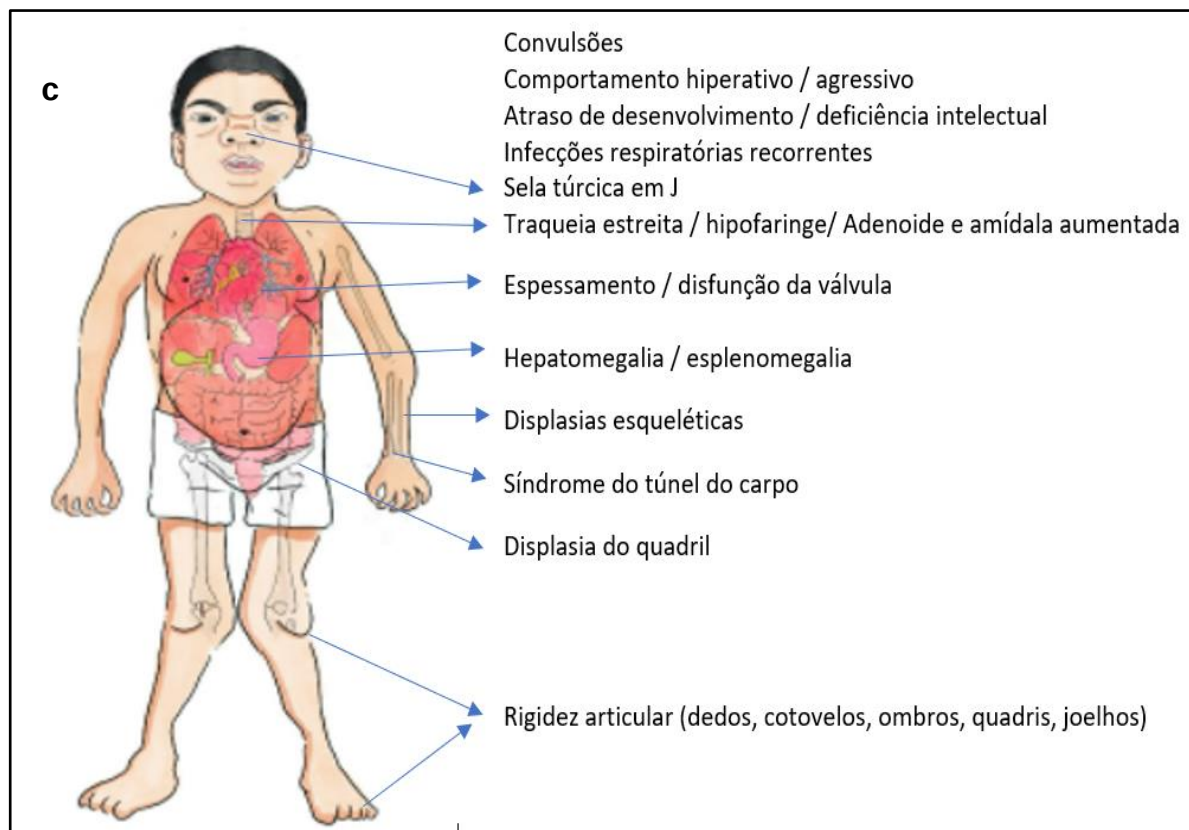


Figura 14 a, b e c - Principais fenótipos das MPS. **Fonte:** Elaborada pela autora. (Características faciais)



Fonte: Elaborada pela autora. (Paciente em perfil e PA)



Fonte: Elaborada pela autora. (Principais sintomas internos)

No entanto, várias manifestações são comuns em outros distúrbios clínicos. Na tentativa de auxiliar no reconhecimento de um paciente com MPS nos estágios iniciais da doença, antes que o dano irreversível se desenvolva, ainda é um grande desafio, pois várias manifestações são comuns em outras patologias. Neste processo, além dos sinais e sintomas, o histórico familiar também é muito importante para orientar o diagnóstico (MARTINS *et al.*, 2018).

Usando os dados dos pacientes incluídos no *Hunter Outcome Survey* (HOS), uma ferramenta de triagem para MPS II, onde pontuação de seis ou mais era considerada uma precisão de 95% para o diagnóstico de MPS II, conforme avaliado nas amostras do HOS, embora isso não tenha sido validado no cenário clínico, pode ser uma referência para novos estudos (COHN *et al.*, 2013).

A raridade da MPS e a inespecificidade de manifestações isoladas, validam estudos que visam investigar pacientes com uma combinação de manifestações, encontrando nestes grupos casos de MPS (OMAR *et al.*, 2019). O quadro 03 resume grupos com fenótipos de alto risco que podem sinalizar a necessidade de uma investigação para MPS e/ou outros diagnósticos diferenciais (KUBASKI *et al.*, 2020).

Quadro 03 - Grupos de alto risco para MPS / diagnósticos diferenciais.

Fenótipo	Principais tipos de MPS	Diagnósticos Diferenciais
“Fenótipo semelhante a Hurler” (características faciais grosseiras, hepatoesplenomegalia, disostose múltipla e mãos em garras)	I, II, VI, VII e MPSPS	Deficiência múltiplas de sulfatases, gangliosidose GM1, Galactosialidose, Mucopolidose, Oligosacaridose
Doença articular progressiva com início na infância	IX; formas atenuadas de outros tipos de MPS	Síndrome de camptodactilia-artropatia-coxa vara-pericardite, síndrome de Blau, Displasia pseudo-reumatóide progressiva, Síndrome de osteólise carpotarsal multicêntrica, Displasia checa
Hidropisia fetal não imune	I, IV e VII	Malformações, distúrbios cromossômicos, outras doenças de depósito lisossômico, infecções, displasias esqueléticas
Atraso / regressão no desenvolvimento e hiperatividade / comportamento agressivo	III	Várias outras causas metabólicas, genéticas e adquiridas de deficiência mental
Displasia espondiloepifisária	IV	Displasia de Dyggve-Melchior-Clausen e outras displasias espondilo-epi (meta) fisárias

Fonte: Kubaski *et al.*, (2020, p. 4). GM1: gangliosidose tipo I; LDs: distúrbios lisossomais; MPSPS: síndrome mucopolissacaridose-plus.

Como observado no quadro 03 estudos apontam que indivíduos afetados com MPS I, II, III e VII apresentam características faciais grosseiras, baixa estatura, deformidades esqueléticas, rigidez articular e frequentemente deficiência mental. Na MPS III, apesar da deficiência de enzimas diferentes caracterizando as formas A, B, C e D, o quadro clínico dos pacientes é muito semelhante (NEUFELD; MUENZER 2001). Como esses sintomas também não são exclusivos das MPS, há uma dificuldade ainda para definir o diagnóstico clínico.

1.5 Diagnóstico laboratorial das MPS

O diagnóstico da MPS começa com uma história clínica completa. Dados como consanguinidade, abortos, heredograma são importantes para afunilar as possibilidades de diagnóstico. A idade de início das manifestações clínicas e a ordem cronológica de evolução, assim como as complicações, são dados essenciais. Os sinais clínicos são o ponto de partida para orientação diagnóstica e aproximação ao tipo de MPS apresentada pelo paciente. O diagnóstico por imagem complementa a investigação inicial, sendo os principais achados relevantes como a disostose óssea

avaliada por radiologia e anormalidades na substância branca e espaços perivasculares em casos graves avaliados por ressonância magnética. (GULLEBART *et al.*, 2011; PERACHA *et al.*, 2018)

Como exposto anteriormente nas MPS ocorre um acúmulo lisossomal dos GAG parcialmente degradados, os quais são excretados na urina em grandes quantidades. Desta forma, diante de uma suspeita clínica de MPS, é possível realizar primeiramente exames bioquímicos na urina, que servem para o direcionamento da investigação da doença (BECK, 2007; PECK *et al.*, 2020). Estes testes podem ser tanto quantitativos quanto qualitativos.

A investigação bioquímica em pacientes com suspeita de MPS começa a partir da triagem urinária na qual são realizados testes qualitativos baseados na turvação urinária (teste de agregação com sais pesados), como por exemplo, o Brometo de Cetil-Trimetil-Amônio (BCTMA), e testes por visualização de manchas metacromáticas em papel impregnado em corantes (Azul de Toluidina). No caso de a triagem preliminar apresentar resultado alterado, é realizado para confirmação dosagem quantitativa de GAG (SCHWARTZ *et al.*, 2001; PECK *et al.*, 2020).

A cromatografia em camada delgada e a eletroforese podem identificar qual tipo de GAG está aumentado, direcionando a investigação para ensaios enzimáticos mais específicos (WAJNER *et al.*, 2001; SILVA, 2015; KUBASKI *et al.*, 2017).

O aumento da excreção de GAG urinários fornece um método de triagem simples, sendo o diagnóstico confirmado pela identificação da enzimática específica deficiente. A análise molecular também desempenha um papel importante na predição do fenótipo, diagnóstico pré-natal e principalmente na identificação de portadores (GIUGLIANI, 2012).

O diagnóstico definitivo das MPS é feito através da mensuração da atividade da enzima lisossomal deficiente, específica para cada tipo de MPS, em plasma, leucócitos, fibroblastos e sangue impregnado em papel filtro (SCHWARTZ *et al.*, 2001; NEUFELD; MUENZER, 2001). Quando a enzima deficiente é uma sulfatase, deve-se recomendar a mensuração da atividade de outras sulfatases para excluir a possibilidade diagnóstica da deficiência múltipla de sulfatases. Para auxiliar na gravidade do fenótipo clínico e na realização do aconselhamento genético, a análise molecular para definir o genótipo da MPS deve ser realizada (VIEIRA, 2007; GIUGLIANI, 2012; BITENCOURT *et al.*, 2019).

As MPS também podem ser identificadas durante o período pré-natal através da quantificação da atividade enzimática em células cultivadas do líquido amniótico e das vilosidades coriônicas (NEUFELD; MUENZER, 2001; PECK *et al.*, 2020).

A Figura 15 detalha o fluxograma para o diagnóstico das MPS desde a suspeita inicial até os exames confirmatórios enzimáticos e molecular.

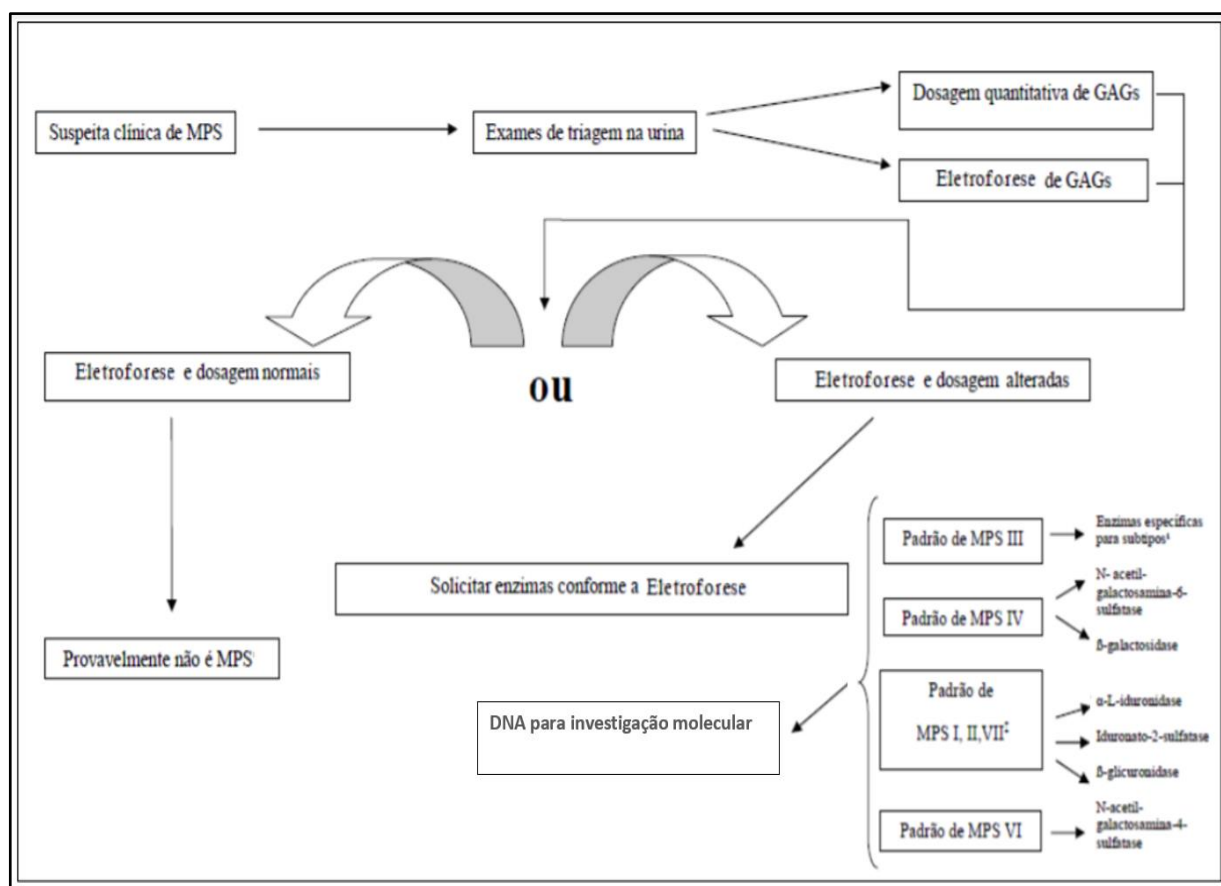


Figura 15 - fluxograma para o diagnóstico das MPS.

Fonte: Adaptado de Neufeld; Muenzer, 2001, Giugliani, 2012.

Atualmente somente 6 doenças são rastreadas pelo Programa de Triagem Neonatal do Sistema Único de Saúde (PNTN/SUS) do Brasil. Recentemente, foi sancionada em 26 de maio de 2021 a Lei nº 14.154, que ampliará para 50 o número de doenças rastreadas pelo PNTN/SUS, que serão incluídas por etapas: Primeira etapa, Hiperfenilalaninemias (excesso de fenilalanina); Hemoglobinopatias (relacionadas à hemoglobina); Toxoplasmose congênita. Segunda etapa: Galactosemias (nível elevado de galactose no sangue); Aminoacidopatias; Distúrbio do ciclo de ureia; Distúrbios de betaoxidação de ácidos graxos. Terceira etapa: Doenças Lisossômica de Depósito (incluindo aqui dentre outras, as MPS). Quarta

etapa; Imunodeficiências primárias (problemas genéticos no sistema imunológico). Quinta etapa: Atrofia muscular espinhal (BRASIL, 2021). A inclusão das MPS na quarta etapa do PNTN/SUS contribuirá para diagnóstico, tratamento e monitoramento precoces, podendo evitar fenótipos clínicos mais graves, uma vez que a evolução dos sintomas das MPS é progressiva.

1.6 Tratamento das MPS

As principais pesquisas para correção do metabolismo dos GAG começaram na década de 70 com culturas de células de pacientes, porém sem grande sucesso quando aplicadas *in vivo*. Uma década depois apenas terapias paliativas estavam sendo aplicadas em pacientes, mas também sem grande sucesso, não gerando mudança significativa no quadro clínico, devido a pequena quantidade de enzima que estes procedimentos produziam (NEUFELD; MUENZER, 2001; MUENZER, 2004).

Com o advento do transplante de medula óssea / transplante de células tronco hematopoiéticas (TMO/TCTH) na década de 80, houve uma melhora mais significativa no quadro geral dos pacientes submetidos a esta terapia, que desde então tem trazido benefícios em alguns casos específicos, principalmente nas formas graves de MPS I e MPS VI (MUENZER, 2004).

Na década de 90 os estudos com a Terapia de Reposição Enzimática (TRE) para MPS foram iniciados. Em 2003, foi aprovada a TRE para uso clínico na MPS I, em 2005 para MPS VI e em 2006 para MPS II (CLARKE, 2008). Na última década, vários estudos apontam a TRE como uma terapêutica útil para compreender os mecanismos bioquímicos e celulares da fisiopatologia das MPS, favorecendo à descoberta de potenciais biomarcadores para o monitoramento do tratamento dos pacientes. Também já foi disponibilizado a TRE para MPS IV A e há perspectivas promissoras para o tratamento da MPS III A. A melhora do déficit cognitivo na MPS II através de administração da TRE diretamente no SNC também tem sido descrita (GIUGLIANI *et. al.*, 2010).

Uma terapia de TRE foi desenvolvida para pacientes com MPS VII. A Vestronidase alfa é uma formulação de β -glucuronidase humana recombinante (rhGUS; UX003—Ultragenyx Pharmaceutical Inc.), aprovada pela *Food and Drug Administration* (FDA) em 2017 e em 2018 pela Agência Nacional de Vigilância

Sanitária (ANVISA-Brasil) para tratar crianças e adultos com MPS VII (WANG *et al.*, 2020).

Estudos estão sendo aprofundados também na terapia de inibição de síntese de substrato, no uso de chaperonas e várias outras técnicas de terapia gênica (WRAITH, 2007, HARTL *et al.*, 2002, BECK, 2007).

1.6.1 Transplante de Medula Óssea / Transplante de Células Tronco Hematopoiéticas (TMO/TCTH)

Na década de 80 foi proposto o tratamento das MPS com transplante de medula óssea / transplante de células tronco hematopoiéticas (TMO/TCTH) (KRIVIT, 2004; LANGE *et al.*, 2006). O transplante de células-tronco hematopoiéticas multipotentes, derivadas de medula óssea, sangue periférico ou sangue de cordão umbilical de um doador, foi um passo importante para os tratamentos iniciais das MPS. Inicialmente, o paciente é submetido a uma terapia imunossupressora para esgotar a resposta imune. Após esta etapa, o paciente recebe um transplante de células saudáveis de um doador compatível e as enzimas são secretadas a partir das células doadoras. Essa técnica foi aplicada com sucesso principalmente em pacientes com MPS I, onde foi capaz de tratar parcialmente o envolvimento do SNC (TURBEVILLE *et al.*, 2011).

Estudos relatam que o TCTH previne muitos dos sintomas clínicos das MPS I, VI e VII, podendo aliviar os sintomas de crescimento, resistência, hepatoesplenomegalia, mobilidade articular, obstrução das vias aéreas superiores e função respiratória. Porém, este tratamento demonstra um efeito limitado na displasia esquelética existente e anormalidades cardiovasculares (WRAITH *et al.*, 2014; SAWAMOTO *et al.*, 2019).

Hobbs *et al.* (1981), relataram que um transplante alogênico de medula óssea em um menino de 9 anos de idade portador da síndrome de Hurler (MPS I) proporcionou uma dramática mudança no aspecto da doença.

O advento do transplante de medula óssea beneficiou alguns casos, principalmente, as formas graves da MPS I e MPS VI (MUENZER, 2004). Porém de uma maneira geral, o TMO/TCTH não tem sido recomendado para as demais formas de MPS I, MPS VI e MPS II (KRIVIT, 2004; LANGE *et al.*, 2006).

De acordo com o um Consenso Europeu que discutiu condutas sobre TRE e TCTH para MPS I, o TCTH é o tratamento de escolha para MPS I forma grave se diagnosticado antes de 2 anos e 6 meses de idade e pacientes com fenótipo intermediário de MPS I podem ser considerados elegíveis se houver doador compatível. A eficácia de TCTH nos pacientes com a forma intermediária não foi comprovada. Todos os pacientes com MPS I (transplantados, não transplantados ou nos quais o transplante não foi bem-sucedido) se beneficiam da TRE. O sucesso do TCTH nos últimos anos tem aumentado, mas os riscos ainda são significativos. Desta forma, o tratamento com TRE deve ser iniciado tão logo o diagnóstico seja realizado, o que pode beneficiar muito os pacientes com MPS I submetidos a TCTH (DE RU *et.al.*, 2011).

Os pacientes com MPS II mesmo apresentando sintomas somáticos e neuropáticos semelhantes aos da MPS I, não são beneficiados pelo TCTH, talvez pela apresentação mais tardia dos sintomas e consequentemente diagnóstico tardio em média aos 3,5 anos. Acredita-se que com a triagem neonatal pacientes com MPS II também possam vir a se beneficiar da TCTH no futuro (SOUILLET *et. al.*, 2003; NAN *et al.*, 2020).

O TCTH possui a vantagem de ter que ser realizado apenas uma vez com efeito vitalício, podendo melhorar as manifestações clínicas da doença, porém não afeta o comprometimento cognitivo preexistente e não é capaz de curar os sintomas ósseos ou na córnea devido à entrega insuficiente de enzimas aos locais. A TRE pré-transplante é recomendada após o diagnóstico e antes do TCTH para otimizar a função do órgão e reduzir a morbidade e a mortalidade (WRAITH *et al.*, 2014; TOMATSU *et al.*, 2016).

No Brasil, a portaria nº 8, de 24 de janeiro de 2018 amplia a indicação de TCTH incluindo pacientes com MPS I no âmbito do Sistema Único de Saúde SUS (<http://conitec.gov.br/>, 2018).

1.6.2 Terapia de Reposição Enzimática (TRE)

A Terapia de Reposição Enzimática repõe a enzima ausente através de infusões intravenosas onde as enzimas recombinantes mimetizam os efeitos

biológicos da enzima nativa por serem molecularmente desenhadas para que possam ser facilmente captadas pelas células dos pacientes (WRAITH *et al.*, 2007).

Estudos com a TRE foram realizados na década de 90, mas se tornou uma realidade aprovada para uso clínico em 2003 para MPS I, em 2005 para MPS VI, em 2006 para MPS II (GIUGLIANI *et al.*, 2010; KAKKIS *et al.*, 2011) e mais recentemente mostrou-se eficaz também para a MPS IV A (LYSENG-WILLIAMSON, 2014). Em 2017 uma TRE para MPS VII foi aprovada pela *Food and Drug Administration* (FDA) e em 2018 pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA-Brasil) (FOX *et al.*, 2015; WANG *et al.*, 2020). Estudos verificam a viabilidade da TRE no tratamento das MPS III A e MPS IIIB (JONES *et al.*, 2016; SAWAMOTO *et al.*, 2019; GROVER *et al.*, 2020).

As TER são administradas de forma endovenosa. Para MPS I é utilizada a laronidase, uma proteína análoga à α -iduronidase humana, produzida por engenharia genética num sistema de expressão de células de ovário de hamster chinês (CHO) (KRIVIT, 2004). TRE para o tratamento de MPS II é administrada a idursulfase, uma proteína glicosilada análoga à iduronato-2-sulfatase humana nativa, produzida através de células humanas (WRAITH *et al.*, 2008). Para o tratamento de MPS VI é utilizada a galsulfase, uma forma recombinante da enzima N-acetilgalactosamina 4-sulfatase, sintetizada a partir de células de ovário de hamster chinês (Harmatz *et al.*, 2008). Na MPS VII a vestronidase alfa é uma formulação de β -glucuronidase humana recombinante (rhGUS; UX003—Ultragenyx Pharmaceutical Inc McCafferty *et al.*, (2019).

A TRE intravenosa resulta em uma melhora parcial dos tecidos moles e das atividades da vida diária (AVD) dos pacientes com MPS I, II, IVA, VI e VII. No entanto, devido a não atravessar a barreira hematoencefálica (BHE), a TRE acaba tendo um impacto muito limitado nas lesões avasculares no osso e na cartilagem ou no SNC e, também, por não interferir de forma significativa na progressão óssea e neurológica da doença, devido ao elevado peso molecular das enzimas recombinantes. Para resolver esta limitação, vários estudos com diferentes formas de administração como a aplicação intra-cefálica e intra-articular da enzima, estão sendo realizados com o objetivo de superar este obstáculo (MUNOZ-ROJAS, 2008; BAGEWADI *et al.*, 2008; AUCLAIR *et al.*, 2010; SAWAMOTO *et al.*, 2019).

Ensaio clínico com pacientes em TER para MPS VI mostraram uma redução rápida e sustentada na excreção de GAG urinários, melhora a longo prazo na

resistência, função pulmonar e taxa de crescimento, e um perfil de segurança aceitável. Estudos indicam que os aumentos no escore z da altura demonstraram ser maiores em pacientes que iniciaram o tratamento antes dos 6 anos de idade (FURUJO *et al.*, 2017; HARMATZ *et al.*, 2017).

A TRE com IDS recombinante para MPS II é eficaz para a maioria dos sintomas periféricos, mas insatisfatório para os distúrbios do SNC. Assim a deterioração neurocognitiva progressiva na MPS II continua sendo um problema crítico para pacientes e pesquisadores (OKUYAMA *et al.*, 2010; GIUGLIANI *et al.*, 2018).

Outra estratégia para controlar os sintomas neurológicos é a modificação das enzimas para a penetrabilidade da BHE. O processo de TRE penetrável pela BHE envolve uma enzima (ex: IDS) fundida com um anticorpo, ou peptídeo, por exemplo, insulina, leptina ou transferrina, que se ligam a seus receptores específicos nas células endoteliais capilares do cérebro para serem transportadas através da BHE (GIUGLIANI *et al.*, 2018; SATO *et al.*, 2020; PARDRIDGE *et al.*, 2020).

Estudos em modelos animais e em humanos, demonstram que quanto mais precoce o início da terapia, menor o comprometimento das articulações, ossos, válvulas cardíacas e cartilagem traqueal e melhores são os efeitos terapêuticos para o desenvolvimento de dentes, ossos e articulação temporomandibular (HARMATZ *et al.*, 2008; CLARKE, 2008, NAGPAL *et al.*, 2022).

A TRE é contraindicada para mulheres grávidas ou que estejam amamentando, a não ser que seja absolutamente indispensável. Pacientes terminais e portadores de uma doença grave associada, cujo prognóstico não se alterará devido ao uso da TER também não devem receber a medicação (GIUGLIANI *et al.*, 2010).

As eventuais reações à infusão são muito particulares para cada paciente, sendo as mais frequentemente relatadas a pirexia, cefaleia, dor abdominal, dispneia, calafrios, artralgia, prurido, hipertensão/hipotensão, urticária e exantema. Desta forma cabe ao médico avaliar a necessidade da pré-medicação com antipiréticos e/ou anti-histamínicos, cerca de uma hora antes do início da TER (GIUGLIANI *et al.*, 2010).

Embora a TRE e o TCTH tenham algumas vantagens retardando a progressão das MPS, existem várias limitações da TRE como necessidade de injeção semanal, circulação curta da droga no sangue, alto custo e penetração limitada para lesões ósseas e do SNC (SAWAMOTO *et al.*, 2018).

1.6.3 Terapia de Redução do Substrato

Enquanto o TRE visa a redução do armazenamento de GAG dentro dos lisossomos através da reposição da enzima deficiente, a Terapia de Redução do Substrato (TRS) baseia-se na utilização de pequenas moléculas que agem como inibidores da síntese de GAG que não podem ser degradados devido à atividade enzimática deficiente, levando a restauração do equilíbrio entre a síntese e a degradação destes compostos. Quando esta molécula inibitória consegue ultrapassar a BHE pode corrigir também as alterações do SNC, não somente as manifestações clínicas em tecidos somáticos (BECK, 2007; WRAITH, 2007; MUNOZ-ROJAS *et al.*, 2008).

Os medicamentos TRS são pequenas moléculas administradas por via oral que podem acessar facilmente todos os órgãos/tecidos e diminuir o armazenamento de GAG e a manifestação da doença. Este tratamento pode ser distribuído por todo o corpo, incluindo cartilagem, olho e cérebro, e apresentar resultados promissores em órgãos/tecidos que não são alcançados pela TRE ou TCTH. A TRS pode ser combinada com outras terapias que visam diferentes tecidos e estágios de progressão da doença. Em contraste com TRE ou TCTH, os medicamentos TRS não são invasivos. A TRS tem sido consideradas uma boa estratégia para controlar as manifestações neurológicas, musculoesqueléticas e oftalmológicas não contempladas pela TRE e TCTH (NAN *et al.*, 2020).

1.6.4 Terapia gênica

A Terapia Gênica consiste na introdução de uma cópia normal do gene (através de vetores virais ou tecnologia de edição de genoma) que corrige o gene defeituoso no genoma, fornecendo genes funcionais visando aumentar a síntese da enzima e permitir que esta seja produzida em quantidades suficientes. Estudos com terapia gênica (pré-clínicos) têm sido realizados para MPS I, MPS II, MPS III-A, MPS III-B, MPS VI e MPS VII (BECK, 2007; TOMATSU, 2013).

Terapias gênicas utilizando diferentes tipos de vetores virais, como adenovírus (AV), vírus adeno-associado (AAV), retrovírus (RV) e lentivírus (LV), fazem parte de inúmeros estudos em estágios pré-clínicos ou clínicos com diferentes vias de

administração, como intravenosa ou direta no SNC via injeção intracerebral (FRALDI *et al.*, 2018).

A terapia gênica para MPS ainda não está aprovada na prática clínica. No entanto, apresenta-se como uma abordagem promissora para o tratamento das MPS e outras doenças, com expectativas de fornecer um tratamento permanente e único. No entanto, as abordagens iniciais usando vetores retrovirais falharam devido à expressão gênica de curto prazo e efeitos adversos. A aprovação de produtos de terapia gênica na China, Rússia e Europa (SHI *et al.*, 2009; WILLYARD, 2012; GRUBER, 2012), e a aprovação pela FDA (Food and Drug Administration) nos Estados Unidos em 2017 da primeira terapia para certos pacientes com uma forma de leucemia linfoblástica aguda, trouxeram novas esperanças para os pesquisadores (FDA, 2017).

Atualmente, as duas principais abordagens da terapia gênica são: 1) terapia gênica *in vivo*, na qual um vírus portador do gene terapêutico é injetado por via intravenosa ou local, e o gene é entregue nas células somáticas dos pacientes; e 2) terapia gênica *ex vivo*, na qual o gene é traduzido em células somáticas derivadas do paciente e depois transplantadas de volta para o receptor (figura 16). Muitos estudos pré-clínicos *in vivo* ou *ex vivo* relatam a terapia gênica para MPS usando roedores e modelos animais de grande porte (SAWAMOTO *et al.*, 2018; WANG D. *et al.*, 2019).

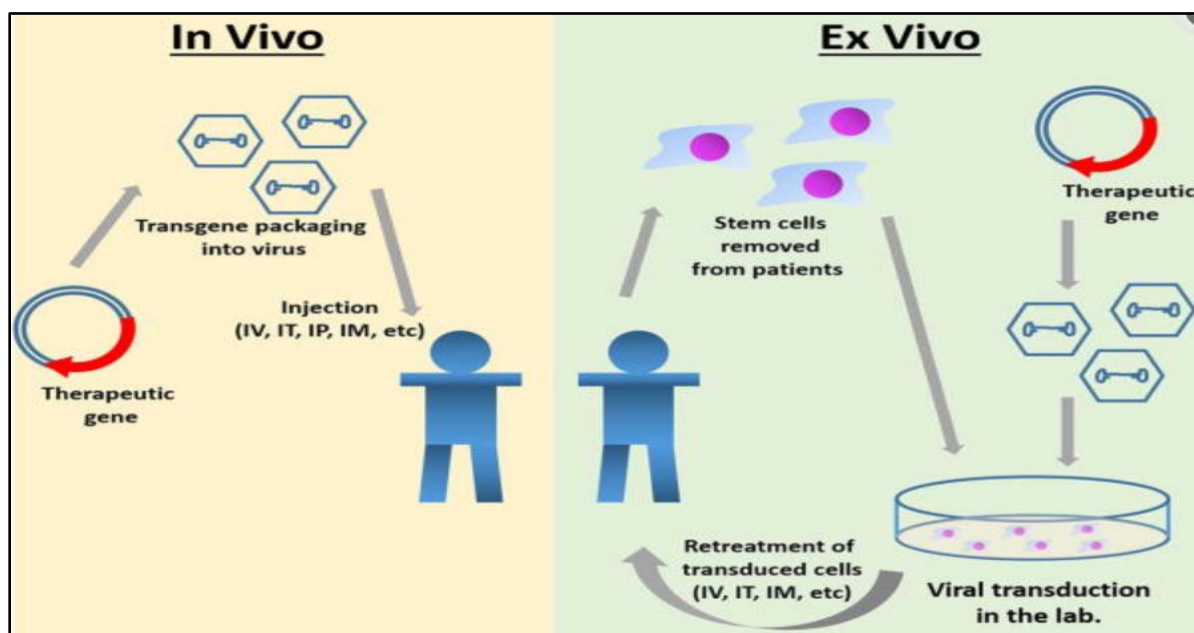


Figura 16 - Estratégias de terapia gênica *in vivo* e terapia gênica *ex vivo*.

Fonte: SAWAMOTO *et al.*, 2018. Pg. 21. Abreviação: IV, intravenoso; IT, intratecal; IM, intramuscular; IP, intraparietária.

A terapia genética *in vivo* à esquerda começa com a implantação do gene terapêutico no genoma viral. O vetor viral é então injetado no corpo via IV, IT, IM ou IP para transduzir as células-alvo. A terapia genética *ex vivo* à direita começa com uma extração de células-tronco do corpo. O vírus com o gene terapêutico transduzirá as células-tronco fora do paciente. Uma vez que o vetor viral transferiu com sucesso o gene para as células, as células são reintroduzidas no corpo via IV, IT ou IM, onde as células-tronco podem se diferenciar e o gene pode ser expresso (SAWAMOTO *et al.*, 2018. Pg. 21).

Essa capacidade de corrigir o fenótipo visando populações de células e órgãos específicos, juntamente com o baixo limiar terapêutico e a promessa de fornecer uma terapia única e definitiva, estimulou o desenvolvimento de uma variedade de abordagens terapêuticas para MPS. Neste contexto, estudos promissores com a edição do genoma que, em comparação com a terapia viral não integrada, como AAV, garante que as modificações sejam consolidadas no genoma, sem risco de diluição com o crescimento do órgão e sem algumas das possíveis complicações imunológicas do AAV (POLETTTO *et al.*, 2020).

Os estudos que se mostraram mais relevantes para fins terapêuticos são baseados em nucleases programáveis e incluem o *clustered regularly interspaced short palindromic repeat* (CRISPR)–Cas9, *zinc finger nucleases* (ZFNs), *transcription activator-like effector nucleases* (TALENs). Até o momento, apenas ZFNs e CRISPR-Cas9 foram usados para desenvolver terapias em MPS e apenas ZFNs atingiram os estágios clínicos de testes em pacientes humanos (BAK *et al.*, 2018; CHRISTENSEN *et al.*, 2019).

1.6.5 Chaperonas

Hartl *et al.* (2011) definem chaperonas moleculares como qualquer proteína que interage, estabiliza ou auxilia outra proteína a adquirir a sua conformação funcionalmente ativa, sem estar presente na sua estrutura final.

Chaperonas são pequenas moléculas que fazem parte de uma classe proteica que inclui uma grande variedade de proteínas que se distinguem pelo seu mecanismo de ação, comportamento e necessidade de energia para o exercício das suas funções (STOLZ; WOLF, 2010; BECK, 2007). Estas moléculas protegem as proteínas defeituosas, e atuam em uma parte do sistema celular que tem a tarefa de controlar a

qualidade da proteína sintetizada. Assim, agem aumentando a atividade residual da enzima deficiente (causada pela presença de variantes missenses) como demonstrados em alguns estudos clínicos para Alzheimer, Parkinson e DLD como Fabry e Gaucher (SAWKAR *et al.*, 2005; GERMAIN *et al.*, 2009; HARTL *et al.*, 2011).

A terapia farmacológica com chaperonas baseia-se no conceito de que as doenças com perda de função são muitas vezes devidas a mutações missense que causam conformação anormal (*misfolding*) das proteínas mutantes. Essas proteínas são reconhecidas pelos sistemas de controle de qualidade do retículo endoplasmático e degradadas. Assim, a perda de função não se deve à perda de atividade catalítica, mas é o resultado da degradação da proteína mutante. Estudos demonstram que as chaperonas farmacológicas podem interagir com essas proteínas, favorecendo sua conformação correta e aumentando sua estabilidade. Como resultado, a atividade enzimática da proteína mutante é parcialmente resgatada (Fig. 17) (BECK, 2007; PARENTI *et al.*, 2013).

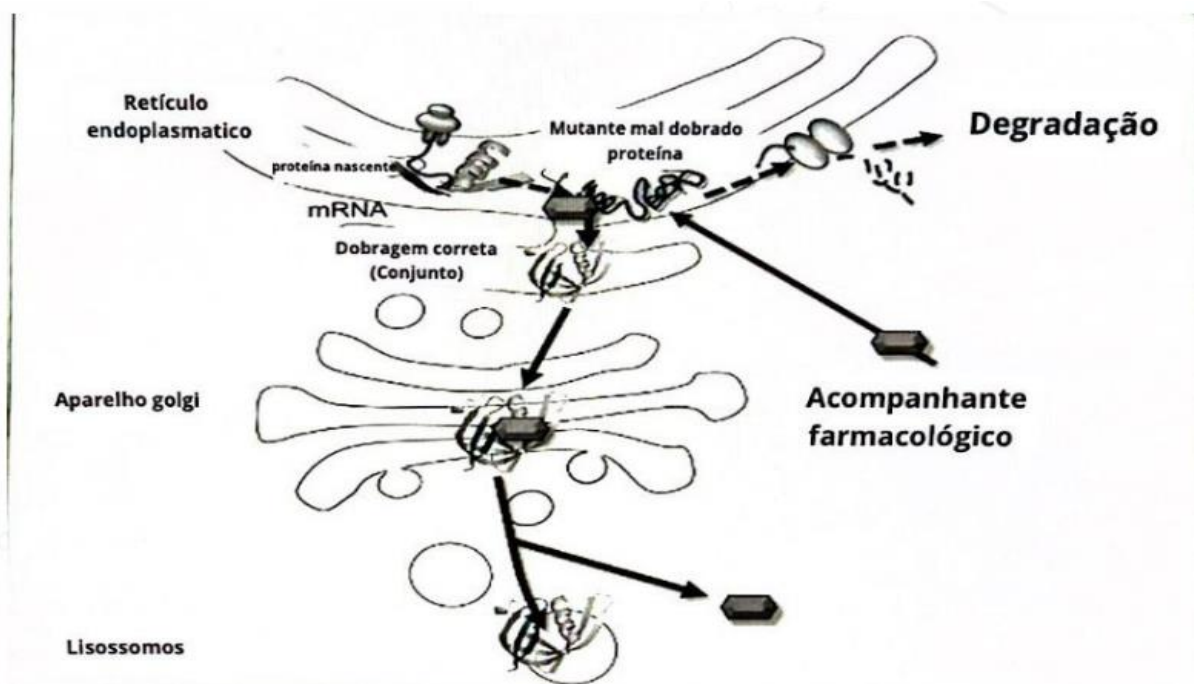


Figura 17 - A terapia farmacológica com chaperonas. **Fonte:** Parenti *et al.*, (2013).

Estudos promissores apontam que é importante manter níveis adequados de chaperonas nas células de pacientes com MPS pois facilita o processo de enovelamento de proteínas. Foi apontado que o aparecimento de mutações impede que a enzima atinja sua estrutura correta e glicosilação adequada, o que resulta no

direcionamento incorreto da enzima. O uso de um inibidor competitivo da enzima e o aumento dos níveis de chaperonas foram capazes de aumentar o nível, bem como a atividade enzimática (ALMÉCIGA-DÍAZ *et al.*, 2019; LOSADA DÍAZ *et al.*, 2019; MATSUHISA *et al.*, 2021).

Níveis reduzidos de chaperonas podem ser uma causa adicional da baixa atividade ou inatividade das enzimas lisossômicas na MPS, e que, portanto, as chaperonas farmacológicas podem, de fato, contribuir para o aumento da atividade da enzima deficiente. No entanto, esta terapia envolve a administração de uma chaperona farmacológica específica para uma enzima lisossômica específica em um único tipo de MPS, para que esta possa atuar na sua conformação correta e evitar a degradação da enzima, na qual mesmo um pequeno aumento em atividade pode aliviar alguns sintomas da doença (ŽABIŇSKA *et al.*, 2023).

1.6.6 Tratamento suporte

As MPS apresentam-se de forma multissistêmica, gerando complicações em vários tecidos e órgãos, exigindo desta forma um atendimento de saúde multidisciplinar ao longo de toda a vida. É necessário o acompanhamento regular por diversas profissões da saúde para verificar potenciais intervenções nas condições clínicas, visando, como forma de diminuir a morbidade e prevenir a mortalidade precoce, um cuidado multidisciplinar a fim de minimizar os sinais e os sintomas causados pelas complicações sistêmicas que o curso degenerativo e progressivo das MPS acarreta (WRAITH; CLARKE, 2006; CAVALEIRO *et al.*, 2013).

O tratamento de suporte deve incluir todos os tratamentos que visam à melhora da qualidade de vida dos cuidadores e pacientes, a manutenção de sua condição clínica, funcionalidade e interação social. A equipe multidisciplinar deve contar com médicos pediatras, neurologistas, geneticista, cardiologistas, fisiatras, pneumologistas entre outros, assim como profissionais da área de reabilitação como terapeutas ocupacionais, fisioterapeutas, fonoaudiólogos, psicólogos, nutricionistas e dentistas. (MUENZER *et al.*, 2009; WRAITH; CLARKE, 2006; GUARANY, 2011; GUFFON *et al.*, 2022).

Várias medidas de suporte podem ser tomadas para contornar as manifestações clínicas da doença, tais como: tratamento medicamentoso (problemas cardíacos, respiratórios, neurológicos, entre outros); uso de equipamentos de suporte,

como aparelho de pressão positiva do ar (CPAP) e aparelho auditivo; tratamento cirúrgico (hidrocefalia, hérnias, algumas alterações esqueléticas, adenoidectomia, amigdalectomia, entre outras); transplante de córnea para os casos de opacificação mais importantes. Não apenas as necessidades médicas, mas também as diversas necessidades psicossociais, educacionais, vocacionais e outras necessidades dos pacientes e de seus cuidadores devem ser levadas em consideração (KING *et al.*, 1984; KHANGURA *et al.*, 2016; NEVIN *et al.*, 2020).

O contínuo acúmulo de GAG leva à disfunção imunológica e à inflamação dos tecidos, apresentando citocinas pró-inflamatórias elevadas, sugerindo que os sintomas contínuos podem ser atribuídos a inflamação local e sistêmica. Estudos com imunomodulador estão sendo realizados visando melhorar a doença esquelética nas MPS I, II e VI. Um estudo piloto mostrou alguma melhora na função física e na dor e, como resultado, um estudo de fase I/II está em andamento (POLGREEN *et al.*, 2017).

Considerando a evolução multissistêmica da MPS VI, diretrizes de monitoramento, avaliações e manejo de rotina foram recomendados no acompanhamento da história natural destes pacientes. As avaliações recomendadas incluem exames clínicos, laboratoriais, radiológicos, higiene bucal e fisioterapia (AKYOL *et al.*, 2019; DEMIS *et al.*, 2021).

Além disso, na necessidade de procedimentos cirúrgicos e demais procedimentos que necessitem de anestesia, que é altamente arriscado para pacientes com MPS, devido a potenciais dificuldades nas vias aéreas, a relação riscos versus benefícios devem ser bem avaliadas. Um cuidadoso plano de manejo pré e peri-operatório é necessário para evitar maiores complicações. Os procedimentos devem ser rigorosamente monitorados e supervisionados por anestesistas experientes (KING *et al.*, 1984; WRAITH *et al.*, 2008 AKYOL *et al.*, 2019; DEMIS *et al.*, 2021).

Outra terapia importante para estes pacientes é a fisioterapia, pois tem por objetivo minimizar as contraturas e rigidez articular e melhorar a força muscular. A fonoaudiologia e a terapia ocupacional também podem contribuir ajudando na aquisição de habilidades para o paciente (MUENZER, 2004; GUFFON *et al.*, 2022).

Visando contribuir para identificação precoce desta doença grave e multissistêmica este trabalho relata a apresentação clínica, bioquímica, genotípica e fenotípica dos pacientes com MPS no estado do Pará.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Analisar o perfil epidemiológico, clínico, bioquímico e genético de pacientes com Mucopolissacaridoses no Estado do Pará.

2.2 Objetivos Específicos

- Comparar as características clínicas dos pacientes com MPS encontradas neste estudo com os dados da literatura.
- Identificar o perfil bioquímico dos pacientes com MPS.
- Identificar o perfil molecular dos pacientes com MPS.
- Avaliar a mensuração de GAG dos pacientes com MPS submetidos à TRE.
- Investigar a associação do genótipo e fenótipo dos pacientes com MPS.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Caracterização da Amostra

O Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo da Universidade Federal do Pará (LEIM/UFPA) e o Hospital Universitário Bettina de Ferro Souza (HUBFS/UFPA) são, atualmente, os principais centros de referência regional no diagnóstico e tratamento de pacientes com MPS, respectivamente.

O Laboratório Regional de Erros Inatos do Metabolismo do Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (LEIM/SGM/HCPA) tem sido parceiro do LEIM/UFPA e do HUBFS/UFPA. Este serviço oferece suporte auxiliar na identificação de várias doenças hereditárias metabólicas. A parceria com este centro foi fundamental para realização deste estudo, uma vez que facilitou a identificação e o diagnóstico bioquímico e molecular de subtipos de MPS.

Este trabalho considerou os dados levantados apenas de pacientes encaminhados ao LEIM/UFPA, com suspeita clínica para MPS.

3.1.1. Estudo Epidemiológico das MPS no Estado do Pará

Para a análise epidemiológica foram considerados 85 pacientes atendidos no LEIM/UFPA, no período de janeiro de 2002 a dezembro de 2022, encaminhados com suspeita clínica ou laboratorial de MPS. As variáveis consideradas para traçar o perfil epidemiológico foram: sexo; local de nascimento; idade de início dos sintomas e do diagnóstico; dados laboratoriais; fenótipo relatado e história familiar. As informações foram selecionadas a partir dos formulários de anamnese do LEIM/UFPA (anexo I) e dos prontuários de atendimento do HUBFS.

Através da estatística descritiva as variáveis foram resumidas, incluindo média, mediana, intervalos, porcentagens e/ou frequências.

3.1.2. Aspectos éticos

O presente estudo levou em consideração os princípios éticos básicos das diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisa envolvendo seres humanos. As

famílias dos pacientes que aceitaram participar deste estudo receberam um termo de consentimento livre e esclarecido (anexo II), além de informações sobre os objetivos da pesquisa.

Embora alguns pacientes tivessem idade superior a 18 anos, eles não foram considerados seus próprios responsáveis legais, em função das limitações impostas pela doença, cabendo aos familiares tal responsabilidade. Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (anexo III).

3.1.3. Análise bioquímica e molecular

O ensaio enzimático para as diferentes enzimas foi realizado nos casos que apresentaram a excreção urinária de GAG elevada. Foram identificados 33 pacientes com algum tipo de MPS. Destes, 27 fizeram diagnóstico molecular.

Apenas os pacientes com MPS do tipo I, II, IVA, VI e VII se encontram sob terapia de reposição enzimática e, portanto, o acompanhamento da mensuração da excreção urinária de GAG antes e após TRE foi realizado.

Foi realizada a coleta de sangue de familiares dos pacientes, de acordo com o padrão de herança genética do subtipo da doença para identificação de possíveis variantes. Foram analisadas 2 amostras de DNA de irmãs de pacientes com MPS II.

3.1.4. Coleta e armazenamento das amostras

O diagnóstico bioquímico das MPS analisadas se deu em duas etapas:

- I- Foram coletadas amostras de urina (30mL) para triagem urinária e para quantificar os níveis de GAG nos pacientes. Estas amostras foram armazenadas a temperatura de -20C°.
- II- As amostras de sangue total foram obtidas através de punção venosa e colhidas em frascos de vidro de 5 a 10 mL (tipo *vacutainer*), contendo anticoagulante heparina e uma parte foi impregnada em papel filtro. Os ensaios enzimáticos foram realizados no plasma, leucócito e sangue impregnado em papel filtro (SIPF), conforme a disponibilidade do material biológico para cada MPS.

Para o diagnóstico molecular, as amostras de sangue foram coletadas com anticoagulante EDTA e/ou SIPF, as quais foram devidamente identificadas e

armazenadas em temperatura adequada para cada tipo de amostra, até o momento da extração de DNA.

3.2 Protocolos laboratoriais empregados na investigação de MPS

3.2.1 Triagem Urinária (método qualitativo)

As análises laboratoriais iniciais necessárias para o diagnóstico de MPS foram constituídas de testes de triagem urinária compreendendo:

I. Teste do Brometo de Cetil-Trimetil-Amônio (BCTMA) descrito por Thomas & Howell (1973) e caracterizado por turvação ou precipitação da urina na presença do reagente BCTMA, como mostrado na figura 18.

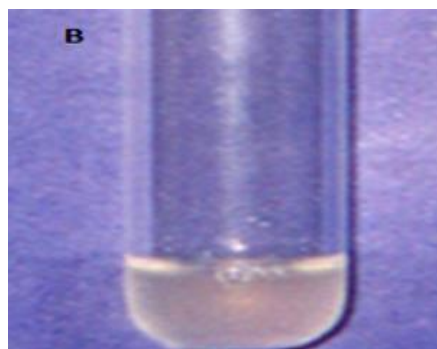


Figura 18 -Turvação observada em urina positiva para MPS no teste de BCTMA.

Fonte: LEIM/ICB/UFPA. (A) negativo; (B) positivo

II. Teste do Azul de Toluidina descrito por Buist (1968) e Thomas; Howell (1973) no qual há a visualização de manchas com coloração púrpura metacromática em papel filtro, como visualizado na figura 19.

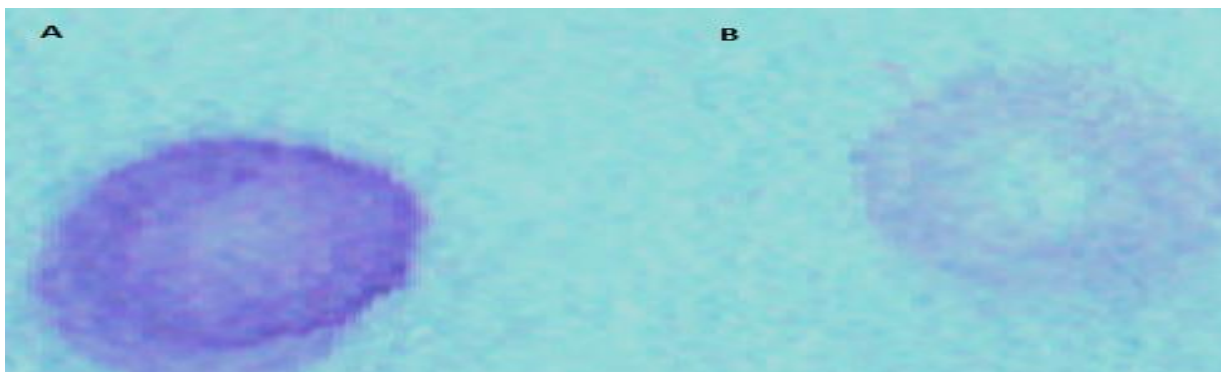


Figura 19- Visualização de manchas com coloração púrpura metacromática no teste do Azul de Toluidina

Fonte: LEIM/ICB/UFPA. (A) Positivo; (B) Negativo.

3.2.2. Quantificação de GAG Urinários (método quantitativo)

A dosagem de creatinina, descrita por Dick (1970), na urina é um procedimento inicial prévio à separação e à quantificação de GAG que visa estimar a quantidade de soluto da amostra em função da excreção do metabólito creatinina.

A dosagem dos GAG foi realizada no LEIM-UFPA através do protocolo espectrofotométrico descrito por De Jong *et al.*, (1989), o qual mede a absorbância da reação obtida entre uma solução tamponada de azul de dimetileno (DMB) e os GAG presentes na urina. O resultado é expresso em μg de GAG/mg de creatinina (protocolo anexo IV). Os valores de referência adotados variam de acordo com a faixa etária de cada paciente (tabela 1) (SILVA, 2015).

Tabela 01 – Valor de referência para dosagem urinária de acordo com a faixa etária

Faixa Etária	Valor de Referência (μg de GAG/mg de creatinina)
<1 ano	136 - 274
01 a 02 anos	80,4 - 264,3
03 a 04 anos	68,1-185,6
05 a 07anos	67,2 - 123,8
08 a 09 anos	44-106
11 a 13 anos	31-97
14 a 18 anos	27,8-96
18 a 20 anos	13 - 59
Acima de 20 anos	13 – 44

Fonte: LEIM/ICB/UFPA.

3.2.3 Eletroforese de GAG

A eletroforese de GAG foi realizada no LREIM/SGM/HCPA, de acordo com protocolos de Pennock, (1976) e Cappelletti *et al.*, (1979). A matriz sólida selecionada para o procedimento é o gel de agarose. Este gel é feito com solução de agarose 1% em placa de vidro nivelada 12x15 cm. As amostras de GAG e padrões precipitados foram aplicadas em poços feitos com pentes de impressão (protocolo anexo V). O resultado é obtido através da observação de bandas de acordo com o gradiente de densidade e tamanho específico de cada tipo de GAG presente na amostra (figura 20).

De acordo com este procedimento, o resultado é capaz de direcionar para o tipo de ensaio enzimático a ser realizado. Quando a enzima deficiente é uma

sulfatase, (como é o caso das MPS II, III, IVA e VI) deve-se recomendar a mensuração da atividade de outra sulfatase para excluir a possibilidade diagnóstica da deficiência múltipla de sulfatases (PENNOCK, 1976; CAPPELLETTI *et al.*, (1979).

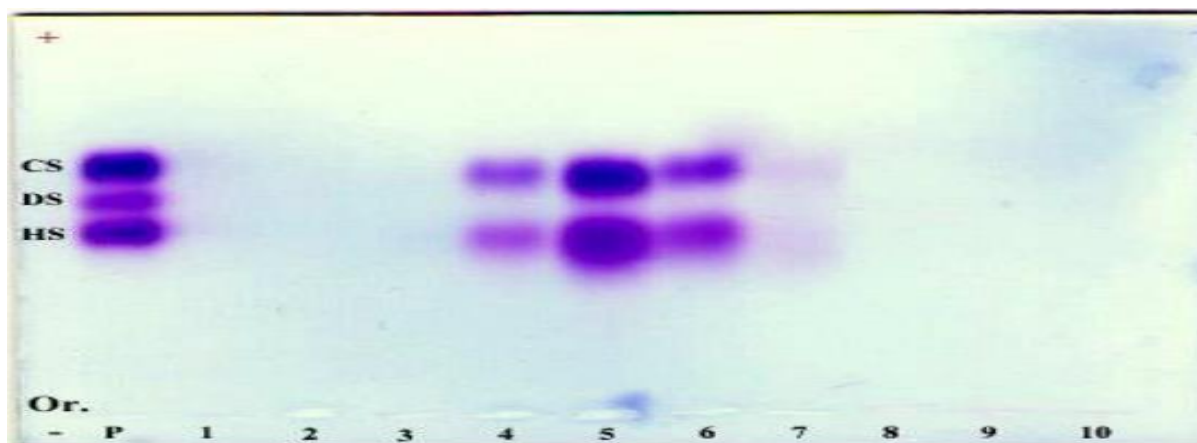


Figura 20 - Eletroforese em gel de agarose. **Fonte:** Neves, 2015. Pg 02.

Obs.: 4, 5, 6 e 7 mostram frações de GAG urinários.

P – Padrão de GAG: mistura de CS, DS e HS; Or. - Origem da corrida eletroforética.

3.2.4 Ensaio enzimáticos

Os ensaios enzimáticos foram realizados no LEIM/ICB/UFPA e LREIM-SGM-HCPA em amostras de leucócitos ou plasma ou SIPF, de acordo com a viabilidade da amostra (quadro 4). A seleção das enzimas testadas foi realizada levando-se em consideração a suspeita clínica e a eletroforese dos GAG. A separação de leucócitos foi realizada segundo a metodologia descrita por Skoog e Beck, (1956). A determinação da concentração de proteínas foi realizada segundo a metodologia descrita por Lowry (1951).

Quadro 4 - Amostras biológicas utilizadas no ensaio enzimático para diagnóstico de diferentes tipos de MPS.

MPS	ENZIMA	Plasma	Leuc.	Fibrob.	Amni.	SIPF
I	α - L-Iduronidase	x	x	x	x	X
II	Iduronato 2 sulfatase	x	x	x		X
III A	Heparan-N-sulfatase	x	x	x		X
III B	α -N-Acetil-glicosaminidase	x	x	x		X
III C	Acetil-CoA:a-glicosamina acetiltransferase		x	x		X
IV A	Galactose-6-sulfatase	x	x	x	x	X
VI	Arilsulfatase B		x	x		X
VII	β -glicuronidase	x	x	x	x	X

Fonte: Procedimento Operacional Padrão (LREIM/SGM/HCPA)

3.2.5 Estudo Molecular

a) Extração do DNA:

As amostras de sangue de cada paciente com MPS e seus familiares (quando disponível) foram coletadas para a extração de DNA no Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo (ICB/UFGA), e extraídas com o mini kit de DNA genômico PureLink® invitrogen (Thermo Fisher Scientific). As extrações foram realizadas de acordo com o protocolo (protocolo anexo VI) e armazenado a -20 °C até o uso. A pureza das amostras e quantidade de DNA extraídas foram avaliadas usando um espectrofotômetro Nanodrop 1000 (Thermo Fisher Scientific).

b) Sequenciamento direto:

Esta etapa da pesquisa contou com a parceria do Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (SGM/HCPA). As amostras foram amplificadas no (Ion Ampli Seq™ Thermo Scientific™) que utiliza uma estratégia de amplificação PCR ultra-multiplex utilizando pequenas quantidades de DNA genômico (BUERMANS; DUNNEN, 2014).

Os 11 genes relacionados com MPS (*IDUA*, *IDS*, *SGSH*, *NAGLU*, *HGSNAT*, *GNS*, *GALNS*, *GLB1*, *ARSB*, *GUSB* e *HYAL1*) foram divididos em três diferentes painéis personalizados de acordo com a semelhança das apresentações clínicas. Painel 1, primeiro composto MPS tipos I, II, VI e VII e posteriormente foi redesenhado para incluir MPS IX. O painel 2 incluiu todos os tipos de MPS III e o painel 3 incluiu os MPS IV tipos A e B. Os dados foram analisados na plataforma de bioinformática Ion Torrent Suite e Ion Reporter (Thermo Sci™) versão 5.6 (BRUSIUS-FACCHIN *et al.*, 2018).

3.2.6. Análise *in silico* de variantes novas

A fim de avaliar os efeitos de variante novas sobre a função das proteínas (enzimas deficientes nas MPS analisadas neste estudo), cinco ferramentas da bioinformática foram utilizadas: PolyPhen-2 (polymorphism phenotyping), PROVEAN (protein variation effect analyzer), Análise SIFT, Análise – Mutation Taster e Análise HOPE (human and organizational performance).

4 Análise de dados

Os dados do sequenciamento foram analisados na plataforma de bioinformática Ion Torrent Suite e Ion Reporter (Thermo Sci™) versão 5.6.

Considerando as inúmeras variáveis encontradas em um pequeno número de pacientes com diferentes tipos de MPS, neste estudo optou-se pela estatística descritiva. Para mensuração dos perfis clínicos e sociodemográficos dos pacientes com MPS, foram utilizadas as seguintes variáveis: idade diagnóstico, procedência, idade de início do tratamento e fenótipo.

As frequências das mutações encontradas (variáveis qualitativas) foram calculadas pela divisão do número de alelos alterados das mesmas pelo número total de alelos pesquisados. Para a determinação dos valores percentuais, este coeficiente foi multiplicado por 100.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Perfil Epidemiológico das MPS no Estado do Pará

No período de janeiro de 2003 a dezembro de 2022 foram atendidos no LEIM/UFPA 85 pacientes com suspeita clínica ou laboratorial de MPS. Destes 39% tiveram diagnóstico de MPS, 24 do sexo masculino e 09 do sexo feminino: 05 MPS I, 11 MPS II, 01 MPSIIIA, 03 MPS IIIB, 01 MPS IIIC, 02 MPS IVA, 09 MPS VI e 01 MPS VII.

Esses diagnósticos tiveram seu início no LEIM, mas em 23 casos a confirmação enzimática foi realizada em parceria com o LHGMPOA, 09 casos foram confirmados no LEIM e 1 caso em laboratório externo e depois encaminhado ao HBFS para tratamento e ao LEIM para acompanhamento.

A MPS de menor incidência no estudo foi a MPS VII com 1 caso, e a de maior incidência foi a MPS II (10 casos, 6 famílias). Cerca de 57% dos pacientes não concluíram a investigação laboratorial e 4% foram diagnosticados com outra patologia (Figura 21).

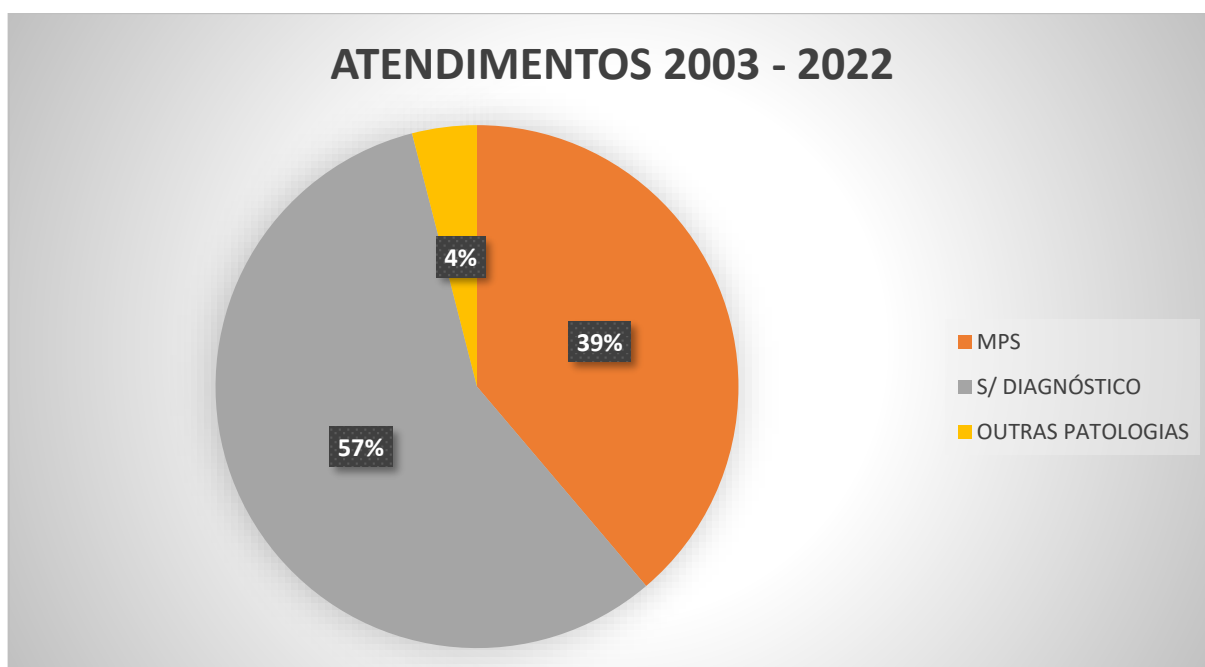


Figura 21: Pacientes com suspeita de MPS atendidos no LEIM/UFPA no período de 01/2003 a 12/2022.

Este estudo também evidenciou diagnóstico tardio na maioria dos pacientes com MPS. Considerando que os sintomas podem aparecer antes do primeiro ano de vida, em poucos casos somente foi possível fazer o diagnóstico de MPS antes de um

ano naquelas famílias que já tinham pelo menos um caso diagnosticado. A idade média de diagnóstico ficou em torno de 7,9 anos desvio padrão 5,3 (Figura 22).

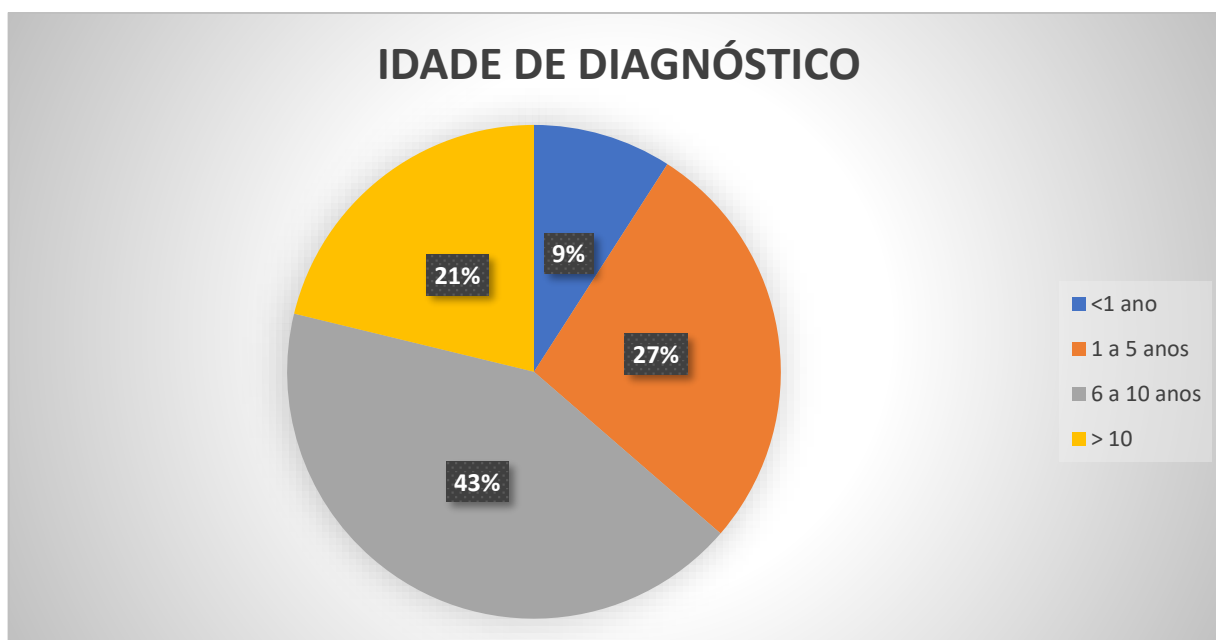


Figura 22: Idade do diagnóstico de MPS

Os trabalhos de Wraith *et al.*, (2008), Martin *et al.*, (2008) corroboram a dificuldade no diagnóstico precoce, mesmo com relatos dos primeiros sintomas no primeiro semestre de vida, sem um relato prévio de MPS na família o diagnóstico acaba ocorrendo após meia década de vida.

A triagem neonatal ou populacional, divide opiniões colocando o aspecto ético em pauta em muitos estudos. Embora em famílias de pacientes com MPS, o apoio ao teste neonatal seja dominante, estudos mostram que identificar possíveis variantes genômicas de significado desconhecido, alelos de pseudo-deficiência ou formas de início tardio da doença, geram uma angústia familiar, fazendo-se necessária o acompanhamento de profissionais como psicólogos e psicoterapeutas, trabalhando em conjunto com geneticistas, para auxiliar e esclarecer as dúvidas que as famílias com diagnóstico precoce, porém nem sempre conclusivo, terão que enfrentar (PEAKE; BODAMER, 2016; DONATI *et al.*, 2018).

Foi observado que 75% dos pacientes deste estudo não residem na capital Belém, fato este que pode estar influenciando o retorno do paciente para dar continuidade ao diagnóstico laboratorial. O mapa do Estado do Pará mostra que não há correlação entre a idade de diagnóstico e local de origem, indicando que o diagnóstico tardio de MPS ocorre independente da localidade (figura 23).

FAIXA ETÁRIA DE PACIENTES DIAGNOSTICADOS NO ESTADO DO PARÁ

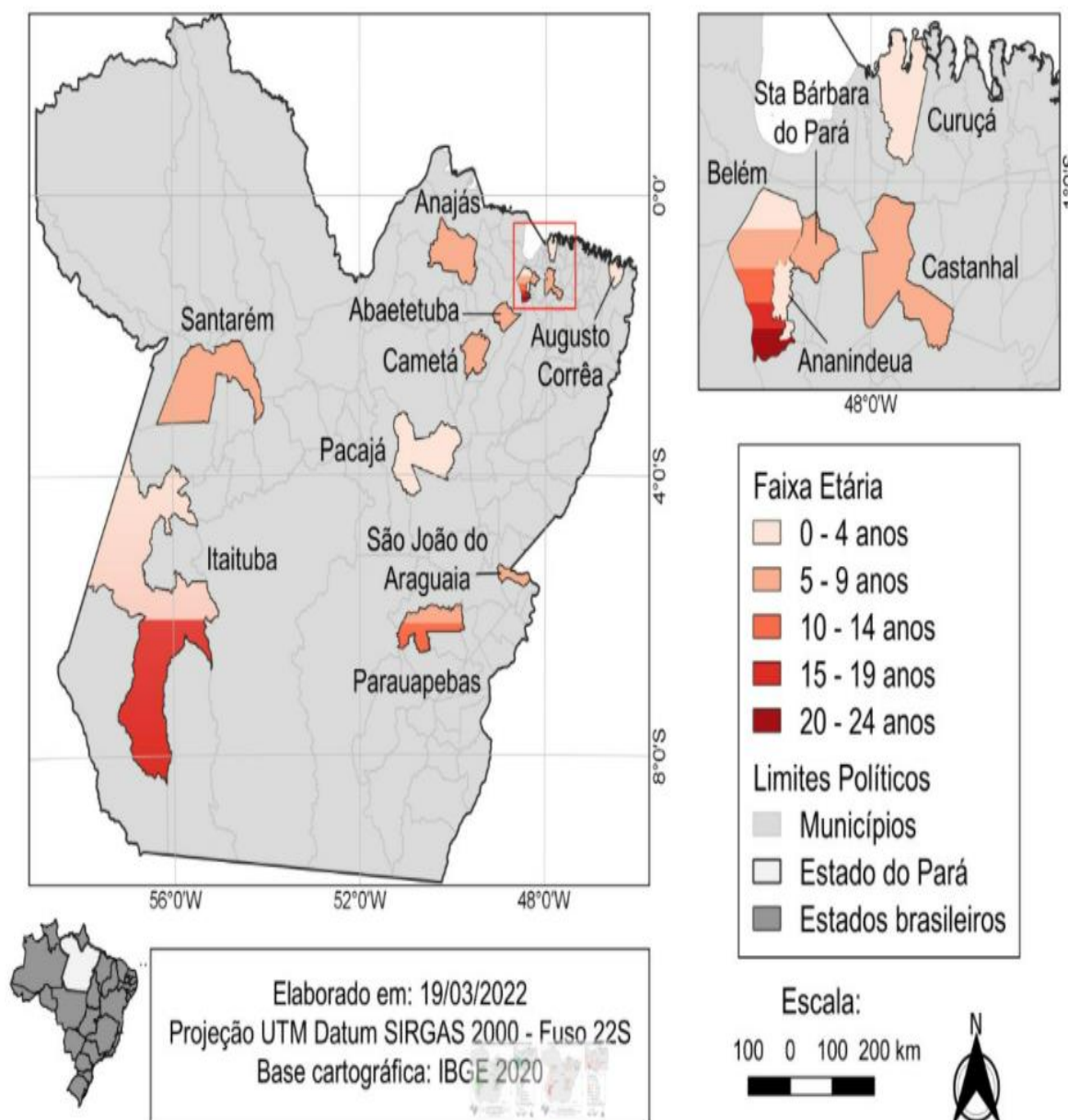


Figura 23: Faixa etária de diagnóstico de pacientes com MPS no estado do Pará

Considerando que não houve associação entre o local de origem e a faixa etária do diagnóstico do paciente, o início dos sintomas pode ser considerado um parâmetro para avaliar a elevada taxa de diagnóstico tardio. Foi observado que a idade relatada de início dos sintomas variou de 1 mês a 15 anos, predominando a faixa etária entre 1 e 5 anos, tendo seu relato inicial mais frequente nas MPS I e II (figura 24). Estes achados também foram observados nos estudos de Wraith *et al.*, (2008), Martin *et al.*, (2008).

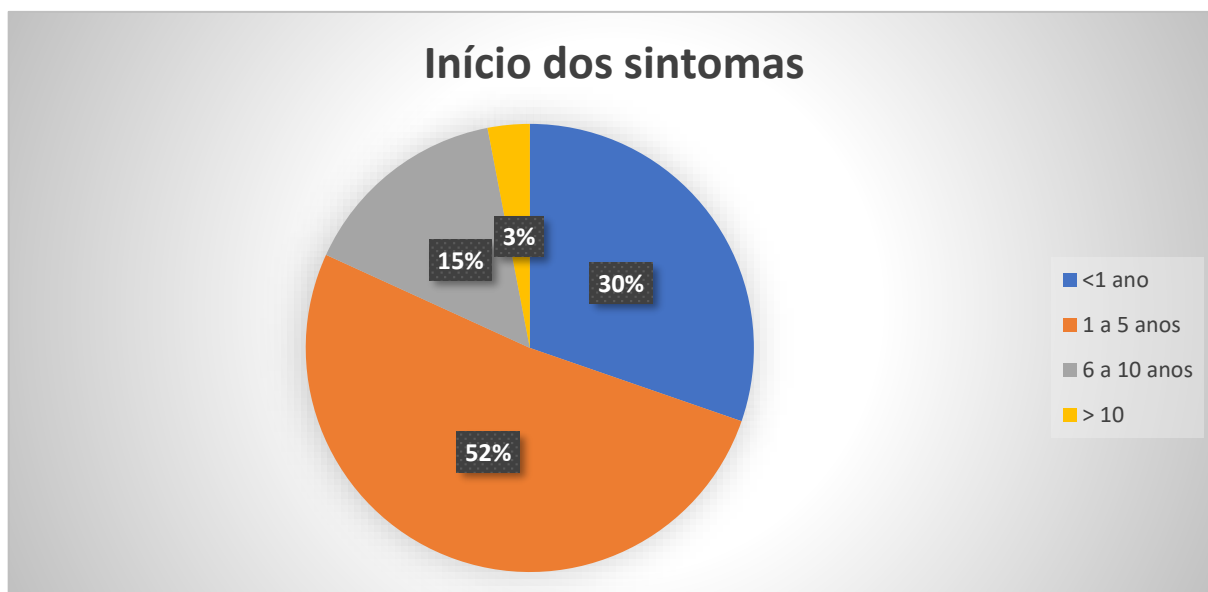


Figura 24: Idade de início dos sintomas em pacientes com MPS

Os achados clínicos e a dificuldade de um diagnóstico precoce são também relatados por Muenzer, (2004); Sofronova, *et. al.*, (2022), Kubaski *et al.*, (2020). Estes estudos relatam que os sintomas clínicos não são exclusivos de pacientes com MPS e somado ao fato da sua heterogeneidade clínica e sua diversidade de características crônicas e progressivas e genótipo apresentados, esses fatores contribuem para um diagnóstico tardio.

5.2. Características clínicas dos pacientes com MPS.

Neste estudo consideramos todos os sintomas relatados em algum momento na ficha de anamnese do LEIM/UFGA e nos prontuários de atendimento do HBFS, independente da sua regressão posterior. O sintoma que apresentou maior frequência, independente do tipo de MPS, foi as faces grosseiras presente em 81,82% dos casos, seguidos de deformidades ósseas com 78,79%, hepatoesplenomegalia 75,76% e infecções respiratórias frequentes 72,73%. Já os sintomas de menos frequência foram lesões de pele 6,06%, TEA 9,09% e convulsões 12,12%.

Os sintomas de maior prevalência são os mesmos apresentados nos estudos de Lehman *et. al.*, (2011), Martins *et al.* (2018), Kubaski *et al.* (2020) e Sofronova, *et. al.*, 2022. Já os de menor frequência, somente as lesões de pele aparecem nos estudos, porém como mesmo com uma frequência baixa TEA e convulsões foram relatados por um percentual significativo de pacientes, com uma frequência até maior

do que as lesões de pele apontadas na literatura, podendo estar ou não relacionado a deficiência enzimática, entendemos ser importante relatar.

Os sintomas precoces apresentados neste estudo, com relatos inferiores a um ano de idade foram: Hernias, hepatoesplenomegalia, seguidos de cabelo grosso, Hipertricose, má oclusão dental, faces grosseiras e displasia de quadril. Sintomas estes que não são exclusivos das MPS.

Tabela 02- Fenótipos apresentados neste estudo que podem ser sugestivos de MPS

Fenótipos apresentados (Média % por MPS)		MPS I	MPS II	MPS III (ABC)	MPS IV A *	MPS VI	MPS VII **
Cabeça	Faces grosseiras	80	100	100	50	66,7	100
	Macroglossia	20	18,1	0	50	33,3	100
	Hipertricose Cab. grosso	20	100	60	0	55,5	0
	Macrocefalia	20	72,7	40	0	44,4	100
	Nublado de córnea	40	0	0	0	66,7	0
	Dentição anormal	40	81,8	20	50	44,4	100
Osteoarticulares	Baixa estatura	60	81,8	20	100	44,4	100
	Rigidez articular	80	72,7	60	50	66,7	100
	Deformidade ósseas	100	90,9	60	100	55,5	100
	Mãos em garra	60	90,9	0	50	55,5	100
Neurológicas	ANPM	40	72,7	80	100	55,5	100
	Atraso na fala DI	60	72,7	100	50	55,5	0
	Hiperativo agressivo	20	54,5	100	100	11,1	0
	Convulsão	20	9,1	20	0	11,1	0
	TEA	0		20	50	0	0
Vias aéreas	Infec. Resp. Frequente	100	72,7	40	50	77,8	100
	Doença obst. V. aéreas	80	54,5	40	100	77,8	0
Abdominas	Hepatoesplenomegalia	80	90,9	80	0	66,7	100
	Hérnia U / I / T	80	81,8	20	0	44,4	100
Outros	Alt. cardíaca	60	36,4	20	50	55,5	0
	lesão na pele	20	0	0	0	11,1	0

Obs.: * 2 pacientes / ** 1 paciente

5.2.1 MPS I

A idade de início dos sintomas nos pacientes com MPSI variaram de 1 mês a 5 anos, com a idade de diagnóstico ficando entre 0,8 a 16 anos, o que nos dá uma média de idade de diagnóstico de 7,7 anos.

Nossos pacientes tiveram o início dos sintomas, bem próximos aos relatados na literatura. Já idade de diagnóstico relatada na literatura foi em média de 1 ano, muito inferior a idade de diagnóstico dos pacientes deste estudo (BECK *et al.* 2014; BARONE *et al.* 2018). Outro ponto divergente foi com relação aos sintomas neurológicos/cognitivos que nos estudos de Barone *et al.* (2018), Shapiro *et al.* (2015) e Muenzer *et al.* (2009), se fazem presentes em 100% dos casos, e em nosso estudo apresentam algum sintoma em no máximo 60% dos relatos. Os demais sintomas estão dentro do relatado nos demais estudos.

5.2.2 MPS II

A MPS II teve um relato de início dos sintomas entre 1 mês e 2 anos (média 1,05 e desvio padrão 0,68) e idade de diagnóstico variando entre 0,8 meses e 17 anos (média 8,2 e desvio padrão 4,7). Estudos de Wraith *et al.* (2008), Parini *et al.* (2016) e Shapiro *et al.* (2021) relatam o aparecimento dos sintomas entre 2 e 6 anos e a média de diagnóstico entre 3 e 4 anos. Quanto aos sintomas, o comprometimento neurológico do nosso estudo obteve uma menor frequência e nenhum caso de convulsão foi relatado. Já nos estudos de Young e Harper (1983) e Jiménez *et al.* (2017) as convulsões apresentam uma frequência de 60%. Os demais sintomas estão próximos as médias relatadas.

5.2.3 MPS III

A idade relatada de início dos sintomas foi de 2 a 5 anos (média 3,6 e desvio padrão 1,1), com uma idade de diagnóstico média de 8,2 anos. Nos estudos clínicos de Ruijter *et al.* (2008) com 29 pacientes com MPS III na Holanda o desenvolvimento psicomotor foi relatado como normal em todos os pacientes durante o primeiro ano de vida. Liang *et al.* (2023) em seus estudos com MPS III na China evidenciou que os

primeiros sinais clínicos da doença foram observados entre 1 e 6 anos (média de 3,5 anos), e a média de idade de diagnóstico foi de 7,6 anos, dados estes próximos aos aqui relatados.

Nosso estudo evidenciou a maior prevalência de sintomas neurológicos do que osteomusculares, corroborando com os estudos de Shapiro *et al.* (2016), Abreu *et al.* (2021), Shapiro *et al.* (2021), Barone *et al.* (2018), Cyske *et al.* (2022).

5.2.4 MPS IV A

Neste estudo foram diagnosticados 02 casos de síndrome de Morquio tipo A apresentando sintomas com idade inferior a 1 ano, e diagnóstico antes dos 3 anos. Os fenótipos apresentados de forma mais precoce e com maior frequência foram os osteomusculares, porém o ADNPM e hiperatividade se fazem presentes nos dois pacientes.

Como em outras MPS a maioria dos pacientes com MPS IVA apresentam-se sem sintomas ao nascimento e geralmente passam a apresentar deformidades esqueléticas dos primeiros anos de idade. Com o acúmulo excessivo de KS e C6S nos ossos, cartilagem e na matriz extracelular (MEC) os pacientes apresentam uma forma específica de displasia esquelética. A displasia esquelética com pescoço e tronco curtos, obstrução traqueal, pectus carinatum, frouxidão articular, cifoescoliose, coxa valga e geno valgo são características comuns em uma forma grave da doença (Tomatsu *et al.* 2016; Tomatsu *et al.* 2012). A maioria destes sintomas foi observado em nossos pacientes, mesmo com um diagnóstico e tratamento relativamente precoce quando comparado as outras MPS deste estudo.

5.2.5 MPS VI

Pacientes com MPS VI apresentam múltiplos fenótipos clínicos em intensidades e frequência bem variados (NEUFELD & MUENZER, 2001; MUENZER, 2004; KUBASKI *et al.*, 2020). Em nosso estudo a idade de diagnóstico e tratamento variaram de 11 meses a 22 anos. Os sintomas respiratórios e osteoarticulares foram os mais frequentes e os menos frequentes foram os neurológicos. Porém, de forma

geral, todos os sintomas relatados na literatura foram identificados em pelo menos um paciente deste estudo com MPSVI.

A TRE quanto mais precoce e contínua consegue retardar o curso clínico da MPS VI, preservando a resistência, destreza funcional e várias competências motoras finas e grossas após 7,7-9,8 anos de tratamento, apresentando também menor comprometimento do crescimento, intercorrências cardíacas e progressão dos fenótipos esperados no fenótipo clássico destes pacientes. Porém a TRE não parece prevenir a progressão da doença esquelética ou ocular a longo prazo. Garcia P. et al., 2021.

5.2.6 MPS VII

A MPS VII possui uma vasta heterogeneidade fenotípica onde sintomas osteomusculares, facies grosseiras, problemas cardiovasculares, abdominais, ADNPM entre outros são descritos na literatura, com uma variação acentuada também na idade de início dos sintomas que podem ser observados na gestação com o aparecimento da hidropsia fetal ou nos primeiros anos de vida com sintomas mais comuns como hernias ou baixa estatura, problemas osteoarticulares, entre outros (MCCAFFERTY & SCOTT, 2019; KUBASKI *et al.*, 2020 GIUGLIANI *et al.*, 2021).

A Síndrome de Sly é considerada ultrarrara e neste estudo foi identificado um paciente com uma nova variante patogênica (GIUGLIANI *et al.*, 2021). Os sintomas apresentados por este paciente foram alterações osteoarticulares, abdominais e faciais.

5.3 Análise Bioquímica de Pacientes com MPS

5.3.1. Triagem Urinária

O primeiro passo após a suspeita clínica é usualmente a triagem urinária para EIM. Este procedimento laboratorial não é específico para MPS, porém alguns resultados positivos como por exemplo o BCTMA e Azul de Toluidina direcionam a investigação, indicando a necessidade da dosagem quantitativa dos GAG urinários. Apesar de não definirem o diagnóstico de MPS, estudos apontam o teste azul de

toluidina e o teste BCTMA urinários como exames iniciais para a triagem de pacientes com suspeita de MPS (BUIST, 1968; THOMAS e HOWELL, 1973; VIANA, 2010).

Em nosso estudo o teste de BCTMA apresentou um percentual de assertividade de 22,7% e o teste de azul de toluidina um percentual de confiabilidade de 75%. Estes testes podem sofrer a interferência de vários fármacos, e, portanto, não são exames de primeira linha para detecção de MPS, porém podem contribuir indicando uma possível patologia, uma vez que são exames de triagem inicial e seu resultado positivo não é exclusivo para MPS, uma vez que valores elevados de GAG podem ser também observados em pacientes com diagnóstico de Mucopolidose e Deficiência Múltipla de Sulfatases.

5.3.2 Dosagem de GAG

A dosagem de GAG urinário apresentou resultado de 2 a 5 vezes superior ao valor de referência de normalidade por idade, em todos os casos positivos para MPS, mostrando ser um importante biomarcador na identificação desta patologia (figura 25).

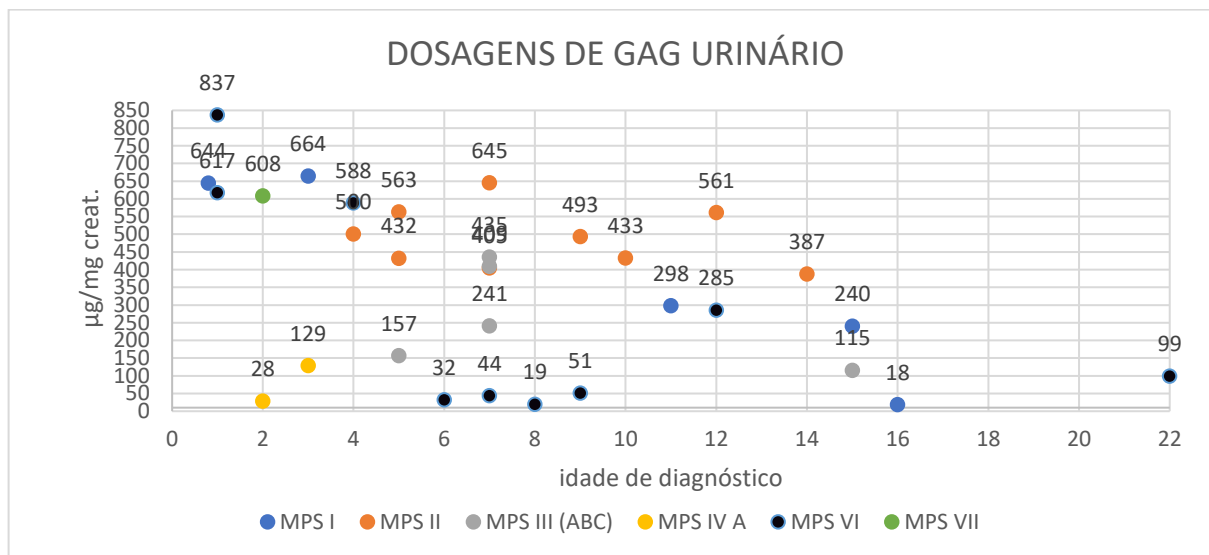


Figura 25 - Primeira dosagem de gag urinário

Inicialmente, a quantificação de GAG na urina era realizada através de técnicas colorimétricas, identificando somente o aumento dos GAG de uma forma geral (Buist, 1968; Thomas; Howell 1973). Atualmente, vários métodos analíticos, como a espectrofotometria de massa, têm utilizado amostras de urina e/ou sangue em papel

filtro, facilitando o transporte destas amostras biológicas, especialmente em países com significativas dimensões geográficas, como é o caso do Brasil.

A sensibilidade e especificidade das novas tecnologias contribuíram não apenas para a dosagem de cada GAG específico, mas também para a identificação de subprodutos que podem ser considerados importantes na conduta clínica (Breier, 2014; Tomatsu *et al.*, 2014). As amostras de urina impregnadas em papel filtro são de fácil armazenamento e facilita o transporte por não requerer refrigeração. Porém, o elevado custo das novas tecnologias acaba comprometendo a aplicabilidade da técnica em grande escala.

Além de sua utilidade no diagnóstico das MPS, a mensuração dos GAG na urina mostrou-se eficaz também no acompanhamento após o início da TRE dos pacientes deste estudo, a saber: MPS I, II, IVA, VI e VII, indicando que a redução deste metabólito está associada a eficácia da TRE (figura 26).

Estudos de Viana, (2010); Giugliani, (2012); Breier, (2014); Bitencourt *et al.*, (2019), também relataram a dosagem dos GAG urinários como um biomarcador útil de fácil acesso e baixo custo no acompanhamento da TRE.

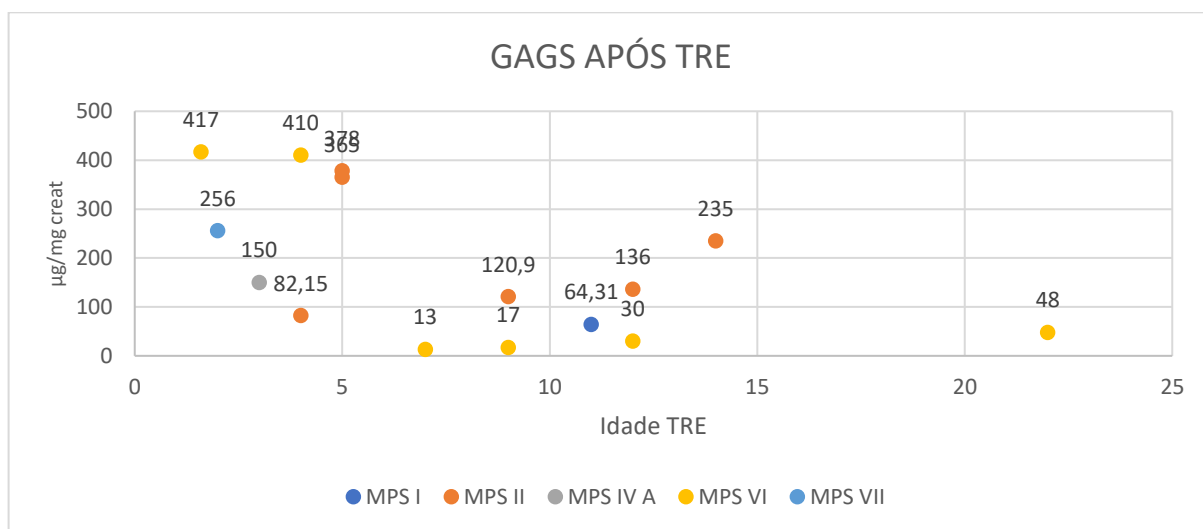


Figura 26 – Dosagem de GAG após TRE

Nos estudos de Karageorgeos *et al.*, (2007), os padrões genotípicos e fenotípicos de pacientes com o mesmo subtipo de MPS que já se encontravam em TRE foram descritos e indicaram que, juntamente à análise de GAG urinários, outros parâmetros bioquímicos (mensuração das atividades enzimáticas residuais em

fibroblastos dos pacientes) são necessários para a determinação do espectro clínico de cada paciente.

Apesar dos benefícios da TRE, a medicação pode causar reações adversas, como pirexia, cefaleia, dor abdominal, dispneia, calafrios, artralgia, prurido, hipertensão/hipotensão, urticária e exantema (rash) (GIUGLIANI et al., 2010).

Os pacientes deste estudo relatam poucas reações à medicação e de baixa intensidade. Porém, devido as infusões semanais intravenosas, o acesso venoso acaba se tornando um empecilho à infusão, chegando a um estado em que para a continuação da TRE é fundamental para o controle dos sintomas e melhora na qualidade de vida a implantação de um cateter venoso de longa permanência, como o cateter de *Port-A-Cath*.

Os cateteres *Port-A-Cath* são dispositivos de borracha siliconada, que possuem em sua extremidade distal uma câmara puncionável, que fica sob a pele embutida no tecido subcutâneo na região do implante. A veia subclávia é a mais escolhida, por apresentar riscos reduzidos de trombose e infecção, quando comparada as demais opções, como a veia femoral e jugular interna (MACEDO et al., 2015).

Esse cateter é uma possibilidade em tratamentos prolongados endovenosos, por causa de sua efetividade na administração de medicamentos por períodos prolongados (DAMACENA et al., 2020). O uso deste cateter tem sido cogitado pela equipe médica em 2 pacientes do estudo, para reduzir o trauma de punções malsucedidas e para possibilitar o tratamento na sua cidade natal com mais segurança.

5.3.3 Dosagem Enzimática

A dosagem enzimática em leucócitos tem sido considerado o padrão ouro para a definição do diagnóstico de MPS (BREIER et al., 2014; GIUGLIANI, 2012). Em nosso estudo, a mensuração das enzimas nestas células ocorreu na maioria dos pacientes 73,3%. Apenas 20,0% dos ensaios enzimáticos foram em SIPF e 6,67% no plasma (tabela 3). Além disso, mesmo não sendo possível utilizar a técnica padrão ouro na maioria dos pacientes, não houve nenhum prejuízo em definir o diagnóstico quando foi possível mensurar a enzima em plasma ou SIPF (tabela 3).

Tabela 3 – Valores de atividade enzimática em matérias diversos

MPS	ENZIMA	ATIVIDADE ENZIMÁTICA			VALORES DE REFERÊNCIA		
		LEUC.	PLASMA	SIPF	LEUC.	PLASMA	SIPF
I	α -L-Iduronidase	0,25	ND	ND	32-56 ^A	6,8 - 13,7 ^B	1,1 - 9,5 ^A
II	Iduronato-2-sulfatase	ND-10,9			31 - 110 ^A		
III A	Heparan-N-sulfatase			0,02			0,19-0,82 ^C
III B	α -N-Acetil-glicosaminidase	0,16		ND	10 - 34 ^A		0,96 - 5,8 ^C
III C	Acetil-CoA: α -glicosamina acetiltransferase	5,7			14-81 ^D		
IV A	N-acetilgalactosamina-6-sulfato sulfatase	3,5			58 - 242 ^D		
VI	Arlsulfatase B	1,02 - 23,12		2,7	72 - 176 ^A		5,3 - 22 ^B
VII	β -glicuronidase			3,5 ^B	30-300 ^B		22-94 ^B

^A nmol/h/mg prot. ____ ^B nmol/h/mL ____ ^C umol/h/L ____ ^D nmol/17h/mg prot.

Para garantir a viabilidade das enzimas lisossomais, útil como padrão-ouro no diagnóstico das MPS, é necessário que a separação dos leucócitos seja realizada no máximo em 72 horas. A partir de 2019 a empresa de correios do Brasil vem atrasando em mais de cinco dias a entrega de amostras de sangue coletado com heparina ao Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, centro latino-americano de referência para o diagnóstico de erros inatos do metabolismo. Esta situação vai contra ao que preconiza a Política Nacional de Atenção Integral a Pessoas com Doenças Raras (Portaria 199, 30/06/2014, MS, Brasil), ou seja, acesso ao diagnóstico e tratamento (quando disponível) precoce de doenças raras de origem genética. Neste caso, nosso estudo recomenda que o Ministério da Saúde do Brasil estabeleça parceria com a empresa de correios com o intuito de evitar o atraso de amostras biológicas de pacientes destinadas a centros de referência no país.

O uso de amostras de SIPF tem sido uma opção para o diagnóstico bioquímico e molecular de alguns pacientes deste estudo, principalmente àqueles que residem distante do nosso Serviço de Referência em Doenças Raras Hospital Universitário Bettina Ferro de Souza (UFPA). Breier *et al.*, (2014) relataram que no campo da pesquisa genética, o uso de amostras biológicas impregnadas em papel filtro é aceito mundialmente, visando facilitar o envio de amostras a laboratórios de referência para análises que se fazem necessárias. Nosso estudo identificou dois pacientes indígenas com MPSII utilizando amostras de SIPF que residem em reservas indígenas de difícil acesso.

5.4 Análise molecular

O diagnóstico molecular é uma importante ferramenta para possíveis ações terapêuticas, como também permite a predição dos fenótipos, pois estudos revelam correlação positiva entre determinadas variantes e fenótipo clínicos apresentados, indicando desta forma uma possível conduta terapêutica e direcionando para o aconselhamento genético (KUBASKI *et al.*, 2020).

Embora o ensaio de atividade enzimática seja considerado o padrão-ouro para o diagnóstico das MPS, testes genéticos moleculares são recomendados (Brady *et al.* 2013 e, sempre que possível, as conclusões diagnósticas devem ser feitas levando em consideração os resultados clínicos, bioquímicos e de genética molecular. A análise molecular é útil para:

- (a) confirmação de um diagnóstico de MPS quando um ensaio enzimático em leucócitos ou fibroblastos não é possível, pois o diagnóstico não pode depender apenas dos GAG urinários e/ou ensaio enzimático em SIPF (GIUGLIANI *et al.*, 2017);
- (b) confirmação de um diagnóstico de MPS quando os resultados da análise da atividade enzimática não são claros (especialmente quando uma alta atividade residual é observada, ou quando as condições da amostra para o ensaio enzimático não são as ideais);
- (c) em casos com baixa atividade enzimática e excreção normal de GAG na urina, onde a análise molecular é necessária para discriminar pseudodeficiência, portador e normal (Bravo *et al.*, 2017);
- (d) previsão do fenótipo, que pode ser importante para decisões de manejo clínico, como é o caso de algumas mutações que têm sido associadas a fenótipos mais leves: MPS I (p.Ser633Trp), MPS IIIA (p.Arg206Pro, p.Ser347Phe/p.Asp444Gly e p.Glu369Lys/p.Pro128Leu), MPS IIIC (p.Gly262Arg e p.Ser539Cys). Enquanto outras variantes foram associadas a fenótipos mais graves: MPS I (p.Trp402Ter e p.Gln70Ter), MPS II (p.Ser333Leu e deleções totais do gene IDS), MPS IIIA (p.Arg433Gln) (PASQUALIM *et al.*, 2015; BRUSIUS-FACCHIN *et al.*, 2018);
- (e) identificação da adequação do paciente a uma terapia específica de mutação, como interrupção de leitura de códons (KAMEI *et al.*, 2014);
- (f) diagnóstico pré-natal, alternativamente ou em adição aos exames bioquímicos de diagnóstico (LEISTNER-SEGAL *et al.*, 2014);

(g) diagnóstico de síndromes semelhante à MPS (como MPSPS, que resulta de deficiência de proteína lisossomal não enzimática, aumento da excreção de GAG e atividade normal das enzimas relacionadas a diferentes tipos de MPS (VASILEV *et al.*, 2020).

Uma expressiva heterogeneidade alélica está presente entre os genes associados às MPS, que é a principal causa do amplo espectro observado nesses distúrbios e nem sempre pode ser correlacionada à atividade enzimática residual (CLARKE, 2008). Mais de 2.200 mutações foram relatadas em todos os 11 genes relacionados às MPS, com a maioria dos indivíduos apresentando mutações privativas (~70%) (AMARTINO *et al.*, 2014; JOSAHKIAN *et al.*, 2021). Este amplo espectro mutacional é composto principalmente por variantes missense/nonsense (64,6%), seguidas por pequenas deleções/inserções/indels (19,6%), mutações intrônicas (8,1%), rearranjos complexos (4%), grandes deleções/inserções/indels (3,6%) e defeitos em regiões regulatórias (0,2%) (<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac>).

Quadro 05- Estudo molecular

MPS	Gene	Cromossomo	Variantes patogênicas	Tipos de Mutações
MPS I	IDUA	4p16.3	p.L3_S16del	Deleção
			p.P533R	Missense
			p.R383H	Missense
			p.W402X	Stop gain
MPS II	IDS	Xq28	p.R468W	Missense
			p.S87N	Missense
			c.880-8 A>G	splice region
			c.1181-1 G>C	splice region
			p.Q272X	Deleção
MPS IIIA	SGCH	17q25	1080delc (p.Val361Asp)	Frameshift
MPS IIIB	NAGLU	17q21	p.Gln566_Val568del (17008delCAGTGCAGG)	Deleção
			R643C	Missense
MPS IIIC	HGSNAT	8p11	c.1348delG (p.Asp450fs)	Frameshift
MPS IVA	GALNS	16q24	p.G301C	Missense
			p.R94L (281G>T)	Deleção
MPS VI	ARSB	5q14	c.1143-1G>C	splice region
			p.L98Q	Missense
			c.1143-8T>G	splice region
			c.275C>T (T92M)	Deleção
MPS VII	GUSB	17q21	p.L292P	splice region
			p.L176F	Missense

Esta heterogeneidade molecular também foi evidenciada em nosso estudo. Foi realizada a análise molecular em 27 dos 33 pacientes com diagnóstico enzimático de MPS. Não foi possível a realização da análise molecular em 6 pacientes, pois não havia amostra de DNA suficiente e nem possibilidade de coleta. Nas análises realizadas foram encontradas 21 variantes patogênicas: 18 previamente descritas na literatura e 3 ainda não relatadas, 5 heterozigoses compostas. O quadro 05 demonstra estes achados.

5.4.1- MPS I

Neste estudo foram diagnosticados 5 pacientes com MPS I e a análise molecular do gene *IDUA* identificou 4 variantes patogênicas já relatadas na literatura: Neste estudo foram diagnosticados 5 pacientes com MPS I e a análise molecular do gene *IDUA* identificou 4 variantes patogênicas já relatadas na literatura:

a) A variante p.L3_S16del, é responsável por uma pequena deleção (c.46_57delTCGCTCCTGGCC). Esta mutação foi encontrada em homozigose em um paciente. Foi relatada inicialmente por Bunge *et al.*, (1994), posteriormente, Neufeld; Muenzer (2001). De acordo com Bunge *et al.*, (1994) a ampla variabilidade clínica observada na MPS I é aparentemente um reflexo da extensa heterogeneidade molecular. Nosso paciente apresenta fenótipo amplo (55% dos relatados neste estudo), porém atenuado apesar de sua mutação ser deletéria.

b) A variante p.P533R (c.1598C>G) aparece em homozigose em um paciente e em heterozigose composta em outro paciente junto com a variante p.Arg383His (c.1148G>A). Trata-se de uma variante patogênica e seus relatos ocorrem tanto em homozigose como em heterozigose (ALIF *et al.*, 1999; LARADI *et al.*, 2005, TEBANI *et al.*, 2016). Na variante p.P533R ocorre uma substituição não conservativa de aminoácidos, que provavelmente afeta a estrutura secundária da proteína. Estudos indicam que essa variante leva a uma redução de 50% na atividade da enzima IDUA e confere menor estabilidade termodinâmica em comparação com a proteína do tipo selvagem (Bie *et al.*, 2013). O paciente em homozigose para essa variante apresenta um fenótipo amplo (80% dos fenótipos da tabela 02) e grave, não só pelo genótipo apresentado, mas também pelo diagnóstico tardio aos 16 anos.

c) **A variante p.Arg383His** (c.1148G>A) ocorre devido a substituição da arginina por histidina, no códon 383 da proteína IDUA. Essa alteração missense afeta a função IDUA (PMID: 12559846). Por esses motivos, essa variante foi classificada como patogênica sendo relatada na literatura associada a pacientes com o fenótipo 'Scheie' atenuado (BUGE *et al.*, 1998; KINGMA *et al.*, 2013).

O paciente em heterozigose composta para as variantes p.P533R e p.R383H, apresenta um fenótipo amplo e atenuado e responde muito bem à TRE.

O paciente com a variante p.Arg383His, mesmo com diagnóstico tardio apresenta poucos sintomas, osteomusculares e respiratórios, apresentando assim o fenótipo 'Scheie' atenuado como relatados em estudos anteriores.

d) **A variante p.W402X** aparece com bastante frequência nos estudos, sendo associada a um fenótipo grave e muito frequente entre os europeus e americanos, respondendo por 17-48% das variantes patogênicas nessas populações. Essa variante resulta em um truncamento da proteína IDUA, causando perda drástica da atividade enzimática (BUNGE *et al.*, 1994; NEUFELD; MUENZER (2001) KINGMA *et al.*, 2013; CLARKE *et al.*, 2019). O paciente homozigoto para a variante p.W402X, mesmo com diagnóstico aos 3 anos, idade inferior à média relatada nos casos aqui apresentados de MPS I (7,7 anos), apresenta fenótipo amplo e grave como previsto na literatura.

5.4.2- MPS II

a) **A Variante p.R468W** é missense e provoca a mudança do resíduo de aminoácido arginina para o resíduo de triptofano na posição 468 da cadeia polipeptídica. Esta alteração causa a redução da hidrofobicidade, visto que ocorre em uma região predominante de resíduos hidrofílicos, sendo o resíduo mutante mais hidrofóbico do que o resíduo do tipo selvagem (CROTTY *et al.*, 1992).

Segundo Kato *et al.*, a substituição do resíduo carregado positivamente Arginina para o resíduo muito hidrofóbicos Triptofano deve resultar na modificação da geometria do sítio ativo da enzima IDS e na mudança significativa da afinidade desta enzima pelo substrato.

De acordo com estudos de Lin *et al.*, (2019) e Chiong *et al.*, (2017) esta variante patogênica contribui para que a enzima IDS apresenta atividade muito baixa e está

relacionada a fenótipos graves. Os sintomas encontrados no nosso paciente com esta variante representam um fenótipo clínico grave, evidenciando alterações osteomusculares, respiratórios, abdominais, atraso do desenvolvimento neuropsicomotor e deficiência intelectual.

b) A variante p.S87N (c. 260G>A). Essa variante patogênica causa a substituição do resíduo serina pelo resíduo asparagina na posição 87 da proteína NRAS. A análise *in silico* prediz que esta variante missense não altera a estrutura/função da proteína. Não foi publicado anteriormente como patogênica ou benigna de acordo com os dados da HGDM e Clinvar. Em resumo, as evidências disponíveis atualmente são insuficientes para determinar o papel dessa variante na doença (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/1490849>).

Com base em informações das plataformas CGD, ClinGen Disease Validity, GenCC, Mondo, PanelApp e gene2phenotype, esta mutação está relatada com um significado incerto, pontuação 2 (Significado incerto se estiver entre 0 e 5.) (<https://varsome.com/variant/hg38/chr1%3A114713830%3AC%3AT?>).

O paciente deste estudo com a variante p.S87N apresentou o início dos sintomas aos 2 anos e diagnóstico aos 7 anos. Apresenta uma grande variedade de sintomas (65% da tabela 2) de forma acentuada, deficiência total de atividade enzimática de IDS (valor de referência: 122,0 – 463,0 nmol/h/mL) e elevada excreção de GAGs urinários: 405 µg/mg creatinina (valor de referência: 44,0 – 106,0 µg/mg creatinina para faixa etária de 07 a 09 anos).

c) A variante patogênica c.880-8 A>G está localizada no intron 6 do gene *IDS* e ativa um sítio de splicing que é crítico, provocando a inserção de 7 nucleotídeos no exon 7 que conseqüentemente leva a um códon de parada e uma cadeia polipeptídica prematura. Contudo esta mutação está associada a um fenótipo clinicamente atenuado. Este estudo também reforça a importância da análise do cDNA na detecção de mutações intrônicas, pois estudos que examinam apenas o gDNA, a ligação entre genótipo e fenótipo pode ser mal interpretada (JIN *et al.*, 2013).

Esta variante foi encontrada em 4 pacientes de uma mesma família, sendo uma irmã portadora e três irmãos diagnosticados com MPSII. Destes afetados, dois apresentam uma variedade de fenótipos clássicos da MPSII repercutindo em fenótipo grave e deficiência intelectual. Apenas um paciente desta irmandade apresenta fenótipo atenuado sem comprometimento intelectual. Desta forma, é possível observar que a relação genótipo/fenótipo não é totalmente precisa, e que outras

variáveis genéticas, ambientais, entre outros, também compõem o quadro de evolução da doença.

d) Variante patogênica c.1181-1 G>C tem sido relatada em pacientes com MPSII associadas a um fenótipo leve. Esta variante é caracterizada como aceitadora de splice (3' splice acceptor), ou seja, ela altera a região de duas bases na extremidade 3' de um íntron, consequentemente ocasiona a deleção de quatro nucleotídeos devido a alteração no sítio de splicing crítico no início do exon nove (ZHAO *et al.*, 2021). Foi diagnosticado um paciente neste estudo apresentando a referida variante patogênica e com 60% dos sintomas relatados na tabela 2, porém sem déficit intelectual.

e) Variante p.Q272X (c.814 G>C) é uma variante ainda não relatada na literatura e foi observada em 2 pacientes indígenas pertencente à etnia Munduruku. Duas ferramentas de análise *in silico* foram utilizadas para analisar o efeito desta variante na proteína IDS:

Análise – SIFT: Esta ferramenta indicou que a substituição na posição 272 do resíduo de aminoácido glutamina por um códon de parada na proteína IDS está prevista para **afetar a função desta proteína** e apresenta score de 0,04. De acordo com os parâmetros da plataforma, aminoácidos com probabilidades < 0,05 são considerados deletérios (figura 27).

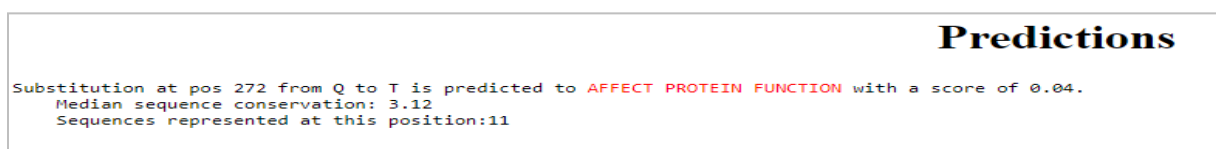


Figura 27. Resultado de predição de efeito funcional na proteína pela ferramenta SIFT.

Análise – Mutation Taster: De acordo com esta ferramenta a variante analisada foi predita como **causadora de doença (patogênica)**. A sequência de aminoácidos é alterada, o que pode afetar as características funcionais da proteína (figura 28).



Figura 28. Resultado de predição de efeito funcional na proteína pela ferramenta Mutation Taster.

Os dois pacientes com MPS II são indígenas pertencentes à etnia Munduruku e residem em aldeia próximo ao município de Jacareacanga (PA). Um deles foi diagnosticado aos 17 anos, apresentou atividade enzimática muito reduzida em torno de 0,10 nmoles/h/mg/proteína (valor de referência 5,0 – 24,0 nmol/h/mg/proteína). Os sintomas iniciais observados foram facies grosseiras, lábios grossos, macroglossia, hérnia umbilical, macrocefalia, mucorréia crônica, disostose múltipla com contratura articular em membros superiores e inferiores, baixa estatura ADNPM, deficiência intelectual e hepatoesplenomegalia. O outro foi diagnosticado aos 8 meses também com atividade muito baixa e apresentou os sintomas iniciais foram facies grosseira, macrocefalia, rouquidão e coriza frequente, hérnia umbilical, hepatoesplenomegalia, ADNPM e deformidade óssea.

É importante o diagnóstico de novos casos e identificação de mulheres portadoras. A população do estado do Pará apresenta elevada miscigenação indígena, no entanto pouco tem sido abordado quanto à investigação de doenças genéticas nestas populações. Políticas de saúde apropriadas, respeitando os traços culturais destas populações, são importantes para as medidas de diagnóstico, tratamento (quando disponível) e aconselhamento genético.

5.4.3- MPS III

a) **Variante 1080delc (p.Val361Asp) MPS IIIA.** De acordo com informações disponíveis na plataforma ClinVar, esta variante gera um códon de terminação prematuro (*frameshift*) e conseqüentemente gera uma proteína truncada ou ausente (WEBER *et al.*, 1997; Zanetti *et al.*, 2019)

Nos estudos de Valstar *et al.*, (2010) a mutação c.1080delC foi relatada como frequente e relacionada a um fenótipo clássico grave. Esse estudo evidenciou também que há uma grande amplitude dos fenótipos relacionados a diferentes mutações na MPS IIIA.

Apesar da literatura correlacionar esta mutação a um fenótipo grave, nosso paciente apresenta 30% dos sintomas relatados neste estudo. O início dos sintomas ocorreu aos 3 anos e o diagnóstico aos 7 anos. O quadro clínico apresentou RDNPM, facies grosseiras, deficiência intelectual, hiperativo/agressivo, infecções respiratórias frequentes, hepatoesplenomegalia com queixa frequente de diarreia.

b) **Variante p.Gln566_Val568del MPS IIIB (17008delCAGTGCAGG).** Trata-se de uma nova variante que está localizada no exon 6 do gene *NAGLU*. Para predizer

sua patogenicidade foram utilizadas 2 ferramentas como segue: (<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000108784-NAGLU>).

PROVEAN: Os resultados obtidos através das análises *in silico* apontaram que esta variante deve ser considerada como **deletéria**, uma vez que esta alteração apresentou um score de -12.876, de acordo com os parâmetros da plataforma, uma variante com score igual ou inferior a -2.5 é considerada DELETÉRIA (figura 29).

PROVEAN Prediction - Job ID: 084866642369125		
• Query sequence (fasta) • Supporting sequence set used for prediction Number of sequences: 90 (fasta, E-values) Number of clusters: 30 • Score thresholds for prediction (1) Default threshold is -2.5, that is: -Variants with a score equal to or below -2.5 are considered "deleterious," -Variants with a score above -2.5 are considered "neutral." (2) How to use a more stringent threshold.		
Variant	PROVEAN score	Prediction (cutoff= -2.5)
566,QAV,.	-12.876	Deleterious

Figura 29. Resultado de predição de efeito funcional na proteína pela ferramenta PROVEAN.

Mutation Taster: Quanto o resultado de predição obtido pela ferramenta Mutation Taster, a variante analisada foi predita como **causadora de doença (patogênica)** (figura 30). A sequência de aminoácidos é alterada, o que pode afetar as características da proteína. Na posição que a deleção ocorre, já existe uma variante causadora de doença conhecida (HGMD CM175634).



mutation t@sting

Prediction: **Deleterious** [Permalink](#)

Summary:

- Amino acid sequence changed
- Known disease mutation at this position (HGMD CM175634)
- Protein features (might be) affected
- Model: complex_aaa
- Tree vote: 187|13 (del | benign) ?

Analysed issue	Analysis result
Phys. location	chr17:40695724_40695732delCAGTGCAGG show variant in all transcripts IGV
Gene symbol	NAGLU
ExAC LOF metrics	LOF: 0.00, missense: 1.45, synonymous: -0.36
Ensembl transcript ID	ENST00000225927
Genbank transcript ID	NM_000263 (exact from MANE)
UniProt peptide	P54802
Variant type	Deletion
Gene region	CDS

Figura 30. Resultado de predição de efeito funcional na proteína pela ferramenta MUTATION TASTER.

Neste estudo foram identificados 3 pacientes com a nova variante, cujos genótipos foram: p.Q566_V568del/p.Q566_V568del (P1); p.Q566_V568del/? (P2);

p.Q566_V568del/R643C (P3). Apesar dos pacientes P1 e P2 residirem no mesmo município (Abaetetuba – PA) não são relacionados entre si e, em ambos, o início dos sintomas foi entre 3 e 4 anos, sem atraso nos marcos de desenvolvimento até esta idade.

P1 – Sexo feminino, diagnosticada aos 7 anos e filha de pais consanguíneos (primos de primeiro grau). Foi relatado pela mãe que o tio paterno e o primo materno apresentam características semelhantes às apresentadas pela P1. Apresentou valores de GAGs elevado 435 µg/mg/creatinina (valor de referência: 44 - 106 µg/mg creatina para faixa etária de 07 a 09 anos). Atividade da enzima NAGLU (Alfa-N-Acetilglicosaminida) foi muito baixa: 0,13 nmol/h/mL (valor de referência: 11,0 a 37,0 nmol/h/mL). Os sintomas apresentados foram RDNPM, facies grosseiras, nariz em sela, hipertricose, hepatomegalia, rigidez articular, dificuldade na fala, deficiência intelectual e irritabilidade.

P2 - Sexo masculino, diagnosticado aos 7 anos. Apresentou elevada excreção de GAGs em torno de 242,27 µg/mg/creatinina (valor de referência: 44,0 a 106,0 µg/mg creatinina para faixa etária de 07 a 09 anos). Atividade da enzima NAGLU foi também muito baixa: 0,14 nmol/h/mL (valor de referência: 11,0 a 37,0 nmol/h/mL). Os sintomas apresentados foram facies grosseiras, nariz em sela, macrocefalia, RDNPM, deficiência intelectual, hipertricose, disfagia, infecções respiratórias frequentes, doença obstrutiva das vias aérea, problemas cardíacos, irritabilidade/agressividade, convulsão, distúrbios do sono, baixa estatura, rigidez articular, deformidades ósseas, pescoço curto, perda da capacidade motora evoluindo para o uso de cadeira de rodas.

A heterozigose no P2 não elimina a possibilidade da existência de outras variantes patogênicas em uma região genômica não contemplada pelo painel, como, mutações intrônicas profundas, na região promotora, repetições, grandes deleções ou duplicações e outras variantes estruturais não detectadas por essa técnica.

Os achados clínicos (fenótipo e evolução da doença) para a variante p.Q556_V568del relatados em nosso estudo estão de acordo com outros achados, (ABREU *et al.*, 2021; HÉRON *et al.*, 2011; BARONE *et al.*, 2018; VALSTAR *et al.*, 2010; SHAPIRO *et al.*, 2021; CYSKE *et al.*, 2022).

Considerando que a MPSIIIB é uma doença genética ultrarrara, a presença de uma nova variante no gene *NAGLU* em pacientes que residem na mesma

localidade (P1 e P2), porém sem parentesco, e o relato de sintomas nos familiares da P1, é possível supor que existam outros casos subdiagnosticados no município.

O paciente **P3** apresentou a variante nova em heterozigose composta com a variante R643C (p.Arg643Cys), já relatada na literatura também como patogênica. P1 e P2, além da nova variante, apresentaram também duas variantes benignas: p.Ser141Ser e p.Arg737Gly, esta última também observada em P3.

A Variante patogênica R643C (p.Arg643Cys): Esta variante resulta na substituição do resíduo de aminoácido arginina pelo resíduo de aminoácido cisteína na posição 643 da cadeia polipeptídica (Weber et al., 1999). Esta variante promove uma alteração não conservativa de aminoácidos localizada na enzima NAGLU, domínio C-terminal da sequência de proteína codificada. Cinco ferramentas *in silico* preveem um efeito prejudicial da variante sobre a função da proteína, confirmando sua patogenicidade. Na Holanda esta mutação apresenta uma elevada frequência, exibindo geralmente um fenótipo atenuado de progressão lenta (WEBER et al., 1999; VALSTAR et al., 2010; MEIJER et al., 2016).

P3 – Sexo feminino e natural de Belém (PA). Os sintomas iniciaram por volta dos 4 anos de idade, o diagnóstico foi muito tardio, próximo dos 15 anos e não apresenta parentesco com P1 e P2. Apresenta genótipo em heterozigose composta: p.Q566_V568del/R643C. Esta variante *missense* é correlacionada na literatura a um fenótipo atenuado. A excreção urinária de GAGs foi elevada e em torno de 115 µg/mg/ creatinina (valor de referência: 13,0 a 59,0 µg/mg/creatinina para a faixa etária de 14,0 a 18,0 anos). A atividade de da enzima NAGLU em amostras de SIPF não foi detectada (valor de referência: 11,0 a 37,0 nmol/h/mL). Os principais sintomas encontrados foram: facies grosseiras, dentição anormal, hipertricrose, macrocefalia, deformidades ósseas (braquidactilia), deficiência intelectual, hiperativatividade, agressividade e TDAH e com uma intensidade forte nos sintomas neurológicos e menor intensidade nos osteoarticulares.

b) **Variante patogênica c.1348delG (p.Asp450fs) MPS IIIC:** A variante se caracteriza pela deleção de uma guanina no exon 13 do gene *HGSNAT* que resulta em um *frameshift*, introduzindo um códon de parada prematuro, resultando em truncamento de proteína. Esta alteração no fenótipo bioquímico causa geralmente um fenótipo grave (MARTINS et al., 2019).

Um paciente do presente estudo apresentou a variante em homozigose com o início dos sintomas e diagnóstico aos 5 anos. Há a presença de uma ampla variedade de sintomas já relatados em outros estudos (NEUFELD & MUENZER, 2001 SOFRONOVA, *et al.*, 2022): fenótipos osteoarticulares e neurológicos graves, facies grosseiras, RNPM, deficiência intelectual, hiperatividade/agressividade, TEA, deformidades ósseas (*pectus carinatum*, *giba*), rigidez articular, hérnia e hepatoesplenomegalia. A excreção urinária de Gags é elevada, resultante da baixíssima atividade da enzima acetilCoA: alfa glicosamina acetiltransferase.

5.4.4- MPS IV A

a) Variante patogênica p.G301C: Kato, *et al.*, (1997) descreveram esta variante no exon 9 do gene *GALNS* com alta prevalência em pacientes colombianos. Essa variante *missense* promove a substituição do resíduo de aminoácido glicina para o resíduo de aminoácido cisteína na posição 301 da cadeia polipeptídica, uma região de domínio catalítico importante da proteína resultando em uma alteração não conservativa de aminoácidos localizada na sulfatase. O efeito da variante resulta em uma diminuição menor que 10% da atividade normal da enzima *GALNS*. A análise de haplótipos por polimorfismos de comprimento de fragmento de restrição no gene *GALNS* sugere que G301C se originou de um ancestral comum, provavelmente nativo americano (Zanetti *et al* (2019).

A análise *in silico* demonstrou um efeito prejudicial da variante na função da proteína. O alelo variante foi encontrado com uma frequência de 0,00011 em 111042 cromossomos de controle. Com base nas evidências descritas acima, a variante foi classificada como patogênica (Kato 1997, Bunge 1997, Dung 2013).

No Brasil, esta mutação foi a segunda mais encontrada (13,3% de todos os alelos brasileiros) e também foi responsável por 46,6% e 12,4% dos alelos relatados na Colômbia e no Canadá, respectivamente (MOISAN *et al.*, 2020; MORENO *et al.*, 2018; TAPIERO-RODRIGUEZ *et al.*, 2018).

Nos estudos de MORENO *et al.*, (2018) a variante patogênica G301C apresentou atividade enzimática de *GALNS* bem abaixo do intervalo de referência normal, 0,06 nmol/mg prot/h (valores de referência: 2,0 a 35,9 nmol/mg prot/h).

O paciente portador da variante G301C apresentou início dos sintomas no primeiro ano de vida e foi diagnosticado aos 3 anos. Apresentou excreção urinária de GAG pouco elevada, em torno de 129,0 µg/mg creatinina (valor de referência: 44,0 a

106,0 µg/mg creatinina para crianças com idade abaixo de 9 anos). Foi observada uma deficiência da atividade da enzima GALNS, 3,5 nmol/17h/mg proteína (valor de referência: 58,0 – 242,0 nmol/17h/mg proteína). Os sintomas observados foram macroglossia, dentição anormal, mão em garra, baixa estatura, deformidades ósseas, ADNPM, agressividade, infecções respiratórias recorrentes, alterações cardíacas, facies pouco infiltrada, *geno vago*, *pectus carinatum*, pescoço curto.

b) Variante patogênica R94L 281G>T: É uma mutação *missense* que causa a substituição do aminoácido arginina por leucina na posição 94 da cadeia proteica. Está associada à baixa atividade enzimática e a um fenótipo grave (SUKEGAWA *et al.*, 2000; RIVERA-COLÓN *et al.*, 2012).

Em pacientes MPSIVA com esta mutação apresentam prevalência de sintomas musculoesqueléticos e articulares, tendo poucos relatos de comprometimento neurológico (TOMATSU *et al.* 2016; KUBASKI *et al.*, 2020). Em nosso estudo a paciente com esta patologia relata início dos sintomas aos 6 meses e diagnóstico aos 2 anos. Apresentou níveis de GAG iniciais pouco elevados, 28,3 mg/mmol creatinina (valor de referência: 5,1 a 17,6 mg/mmol de creatinina para a faixa etária entre 1 a 2 anos de idade) e valores enzimáticos não detectáveis. O quadro clínico foi caracterizado pela presença de sintomas neurológicos (TEA, ADNPM, DI e hiperatividade), osteomusculares (displasia de quadril característica da MPS IV), baixa estatura, rigidez articular e pescoço curto. Os sintomas neurológicos não são comuns em pacientes com MPS IV, desta forma estes sintomas podem ou não estar ligados a patologia ou mutação apresentada.

5.4.5- MPS VI

a) Variante patogênica c.1143-1G>C: Essa variante ocorre em sítio de *splicing* promovendo a deleção do exon 06 no gene *ARSB* e produzindo um *frameshift* que resulta na codificação de uma proteína truncada. Com base no impacto drástico na função da proteína *ARSB*, esta variante foi classificada como patogênica para MPS VI (GARRIDO *et al.*, 2007)

Esta mutação foi relatada em quatro estudos nos quais é encontrada em pelo menos 14 pacientes com MPS VI, incluindo um homozigoto e 13 heterozigotos compostos, apresentando fenótipos clínicos variáveis de intermediário a grave e níveis

enzimáticos baixos (GARRIDO *et al.*, 2007; KARAGEORGOS *et al.*, 2007; GARRIDO *et al.*, 2008; GIRALDO *et al.*, 2016).

Nosso estudo relata um paciente com esta mutação em homozigose. Paciente teve o início dos sintomas com 1 ano e 3 meses e diagnóstico aos 3 anos. Apresenta um fenótipo variável e contendo cerca de 76,2 % dos sintomas demonstrados na tabela 2 para MPSVI: grave comprometimento osteoarticular, comprometimento respiratório, cardíaco, facies grosseira e opacidade de córnea, sem comprometimento intelectual. Estes sintomas são comumente encontrados em outros estudos (KUBASKI *et al.*, 2020).

b) Variante patogênica p.L98Q: Esta variante promove a substituição do resíduo de aminoácido leucina para o resíduo glutamina na posição 98 da cadeia proteica. De acordo com o relatório gerado pela ferramenta de bioinformática Human and Organizational Performance (HOPE), o resíduo mutante é maior que o resíduo selvagem e o resíduo selvagem é mais hidrofóbico. Além disso, essa variante converte o resíduo de tipo selvagem em um resíduo que não prefere α -hélices como estrutura secundária.

A variante p.L98Q de acordo com os estudos de Karageorgos *et al.*, (2007), Richards *et al.*, (2015) e Tomanin *et al.*, (2018) está localizada no exon 1, missense e provavelmente patogênica. No nosso estudo foram encontrados 3 pacientes com esta variante em homozigose: duas irmãs e um primo. Há um outro caso de MPSVI nesta família (primo) confirmado pelo quadro clínico, aumento de GAGs e diminuição da atividade de ARSB. No entanto, o diagnóstico molecular ainda não foi realizado.

As duas irmãs tiveram seus diagnósticos com 7 e 9 anos, respectivamente. Apresentaram 71,4% dos sintomas relatados na tabela 2, não apresentando comprometimento neurológico, como previsto na literatura para esta patologia. Ambas são responsivas à TRE, porém a infusão venosa está se tornando cada vez mais difícil em uma das pacientes devido a dificuldade de um bom acesso venoso, sendo sugerido a implantação do *Port-A-Cath* para a realização das infusões.

Os primos tiveram início dos sintomas e diagnóstico no primeiro ano de vida. Os pacientes apresentam poucos sintomas (19,0 a 40,0% como demonstrado na tabela 2) sem comprometimento neurológico ou osteomuscular devido a identificação e tratamento precoce. Relato esse que também está de acordo com a literatura (KUBASKI *et al.*, 2020).

c) Variante patogênica c.1143-8T>G: Esta variante foi relatada por Petry *et al.*, (2005), apresentando grande frequência nos estudos com pacientes espanhóis e argentinos com MPS VI. A análise de RNA demonstrou que a variante leva *skipping* (salto) do exon 6 do gene *ARSB*, com consequente mudança da matriz de leitura e geração de códon de parada prematuro. A combinação do mecanismo molecular, com interrupção precoce da tradução proteica, característica da região onde ela se encontra e a correlação deste gene com os sintomas clínicos, indicam que esta variante seja patogênica (Garrido *et al.*, 2007; KARAGEORGOS *et al.*, 2007).

Foram identificadas duas irmãs com esta variante em heterozigose composta com a mutação p.T92M. Ambas tiveram diagnóstico tardio aos 12 e 22 anos, respectivamente. Apresentaram quadro clínico considerado leve com 19,0% e 33%, respectivamente, dos sintomas demonstrados na tabela 2: hepatoesplenomegalia, infecções respiratórias frequentes e rigidez articular, sem sintomas neurológicos ou deformidades ósseas.

d) Variante patogênica c.275C>T (T92M): Esta variante promove a substituição do aminoácido treonina no códon 92 por metionina. A treonina na posição 92 é bastante conservada nas diversas espécies biológicas e programas computacionais de predição *in silico* de patogenicidade sugerem que sua substituição por metionina seja potencialmente deletéria. Esta variante está presente em heterozigose em 3 em cerca de 96.000 indivíduos na população mundial e já foi previamente descrita na literatura associada ao quadro de MPS VI (LITJENS *et al.*, 1996; TOMANIN *et al.*, 2018). Esta variante foi encontrada em heterozigose composta nas duas irmãs com a variante c.1143-8T>G já mencionadas.

5.4.6- MPS VII

a) Variante patogênica p.L292P: Esta nova variante está localizada no exon 5 do gene *GUSB*. Para predizer sua patogenicidade foram utilizadas 5 ferramentas como segue: (<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000169919-GUSB>).

Análise - Poliphen-2: Variante (p.Leu292Pro): Quanto o resultado de predição obtido pela ferramenta Poliphen-2, a nova variante foi considerada **potencialmente prejudicial**, com um *score* de 1.000 (sensibilidade: 0,00; especificidade: 1,00) conforme (Figura 31).

This mutation is predicted to be **PROBABLY DAMAGING** with a score of **1.000** (sensitivity: **0.00**; specificity: **1.00**)

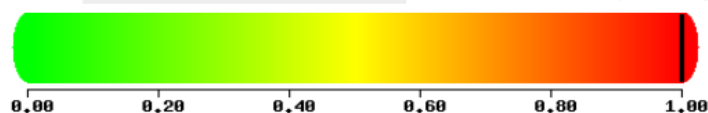


Figura 31. Resultado de predição de efeito funcional na proteína pela ferramenta Poliphen-2.

Análise – PROVEAN: Os resultados obtidos através das análises *in silico* apontaram que a variante c.875T>C (p.Leu292Pro) deve ser considerada como **deletéria** visto que esta alteração apresentou um score de -3.480. De acordo com os parâmetros da plataforma, uma variante com score inferior a -2.5 é considerada deletéria (figura 32).

PROVEAN Prediction - Job ID: 347297292226531		
• Query sequence (fasta) • Supporting sequence set used for prediction Number of sequences: 107 (fasta, E-values) Number of clusters: 30 • Score thresholds for prediction (1) Default threshold is -2.5, that is: -Variants with a score equal to or below -2.5 are considered "deleterious," -Variants with a score above -2.5 are considered "neutral." (2) How to use a more stringent threshold.		
Variant	PROVEAN score	Prediction (cutoff= -2.5)
L292P	-3.480	Deleterious

Figura 32. Resultado de predição de efeito funcional na proteína pela ferramenta PROVEAN.

Análise - SIFT: Variante (p.Leu292Pro): A substituição na posição 292 de L para P está prevista para **afetar a função da proteína** e apresenta score de 0,00. De acordo com os parâmetros da plataforma, aminoácidos com probabilidades < 0,05 são considerados deletérios (figura 33).

Predictions
Substitution at pos 292 from L to P is predicted to AFFECT PROTEIN FUNCTION with a score of 0.00. Median sequence conservation: 3.56 Sequences represented at this position:7 WARNING!! This substitution may have been predicted to affect function just because the sequences used were not diverse enough. There is LOW CONFIDENCE in this prediction.

Figura 33. Resultado de predição de efeito funcional na proteína pela ferramenta SIFT.

Análise – Mutation Taster: A variante analisada foi predita como **causadora de doença (patogênica)**. A sequência de aminoácidos é alterada, o que pode afetar as características da proteína e sítios de *splicing* (figura 34).

Figura 34. Resultado de predição de efeito funcional na proteína pela ferramenta MUTATION TASTER.

Análise - HOPE: Esta ferramenta obteve as seguintes informações:

a) Propriedade dos aminoácidos: O resíduo mutante é menor que o resíduo do tipo selvagem. A diferença de tamanho notada tem o potencial de causar possível perda de interações externas (figura 35).



Figura 35. Estrutura esquemática do resíduo de aminoácido Leucina e do resíduo de aminoácido mutante Prolina, na posição 292. A espinha dorsal, que é a mesma para cada aminoácido, é de cor vermelha. A cadeia lateral, única para cada aminoácido, é de cor preta.

b) Conservação e Domínios: O resíduo do tipo selvagem é muito conservado, mas alguns outros tipos de resíduos também foram observados nesta posição. O resíduo mutante não estava entre os outros tipos de resíduos observados nesta posição em outras proteínas homólogas. No entanto, foram observados resíduos que possuem algumas propriedades em comum com o seu resíduo mutado. Isso significa que, em alguns casos raros, sua mutação pode ocorrer sem danificar a proteína. Além disso, o resíduo mutante está localizado próximo a uma posição altamente conservada. O resíduo mutado está localizado em um domínio que é importante para a atividade da proteína e em contato com outro domínio que também é importante para a atividade. É possível que essa interação seja importante para a função correta da proteína. Adicionalmente, a interação entre esses domínios pode ser perturbada pela mutação, o que pode afetar a função da proteína (figuras 36 e 37).

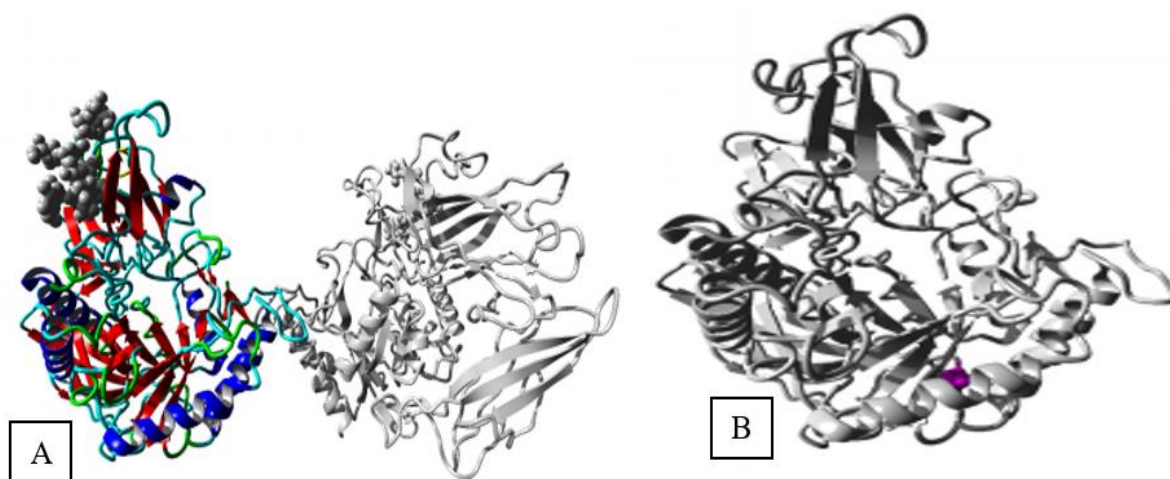


Figura 36. Representação em 3D da proteína mutada: **A.** Visão geral da proteína na apresentação de fita. A proteína é colorida por elemento; α -hélix=azul, β -fita = vermelho, volta=verde, 3/10 hélix=amarelo e bobina aleatória= ciano. Outras moléculas no complexo são coloridas de cinza quando presentes. **B.** Visão geral da proteína na apresentação de fita. A proteína é de cor cinza, a cadeia lateral do resíduo mutante é de cor magenta e mostrada como pequenas bolas.

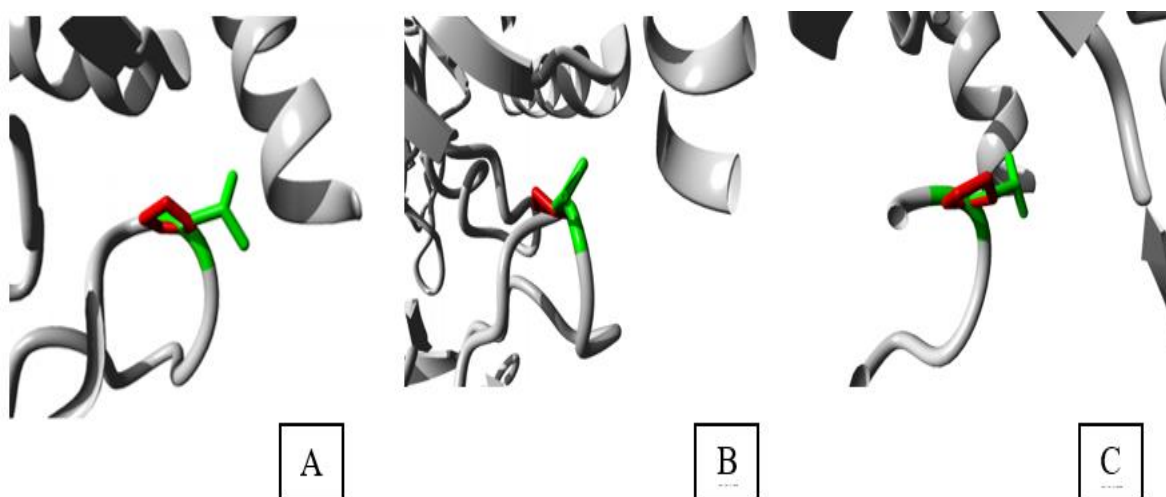


Figura 37. A. Close da mutação. A proteína está colorida em cinza, as cadeias laterais do tipo selvagem e do resíduo mutante são mostradas e coloridas em verde e vermelho, respectivamente. **B** e **C.** Close da mutação, vista de um ângulo ligeiramente diferente.

A características fenotípicas mais frequentemente relatadas em pacientes com MPS VII são facies grosseira, sobrancelhas grossas, tronco curto e pescoço curto, baixa estatura, disostose múltipla e baixa estatura (MONTANO *et al.* 2016, KUBASKI *et al.*, 2020).

Nosso estudo identificou um paciente heterozigoto composto para esta variante: c.526C>T (p.Leu176Phe)/c.875T>C/(p.Leu292Pro). A mutação c.875T>C (p.Leu292Pro) não foi relatada anteriormente na literatura. Este paciente apresentou fenótipo moderado. Os primeiros sintomas aos apareceram aos 6 meses e diagnóstico

aos 2 anos de idade. Os sintomas iniciais foram icterícia persistente, hepatoesplenomegalia e hérnia umbilical, posteriormente, apresentou características faciais grosseiras, macroglossia, macrocefalia, dentição anormal, baixa estatura, rigidez articular, deformidades ósseas (pescoço curto, pés tortos) e atraso no desenvolvimento neurológico. Parte destes sintomas neste paciente foram relatados por Giuliani, *et al.*, em 2021, baseado na condição do paciente até aquele momento, sendo crônica e com uma condição clínica frequentemente evoluindo. A análise e descrição contínuas da evolução clínica do paciente são importantes para futuros estudos.

Essa heterogeneidade clínica e o fato da maioria dos pacientes com MPS VII serem homozigotos, dificulta estabelecer um padrão fenotípico ou correlação genótipo-fenótipo para uma mutação tão rara. A nova variante c.875T>C (p.Leu292Pro) foi relatada no paciente deste estudo por, Giugliani, *et al.*, 2021.

b) Variante patogênica c.526C>T (p.L176F)

As modificações provocadas pela variante p.Leu176Phe já foram descritas no estudo de KHAN *et al.* (2016), assim como outras variantes para MPS VII. Essa alteração foi relatada como prejudicial devido causar o aumento da estabilidade em uma região muito conservada. Tal aumento da estabilidade que provocaria patogenicidade dessa variante em virtude do aumento da força das ligações de hidrogênio. No entanto, a causa real da maior expressão ainda se mostra desconhecida. Esta variante foi encontrada no paciente MPS VII heterozigoto composto com a variante L292P, descrito acima.

6. CONCLUSÃO



mutation t@sting

[documentation](#)

Prediction

Summary

analysed issue

name of alteration	no title
alteration (phys. location)	chr7:65441039A>GN/A show variant in all transcripts IGV
HGNC symbol	g.6263T>C
Ensembl transcript ID	ENST00000304895
Genbank transcript ID	NM_000181
UniProt peptide	P20236
alteration type	single base exchange
alteration region	CDS
DNA changes	c.875T>C cDNA: 1006T>C g.6263T>C
AA changes	L292P Score: 98 protein score (g)
position(s) of altered AA	292
if AA alteration in CDS	no
frameshift	Variant was neither found in ExAC nor 1000G.
known variant	Search ExAC

disease causing

- amino acid sequence changed
- protein features (might be) affected
- splice site changes

[hyperlink](#)

Model: *simple_aaa*, prob: 0.9999999996932 [explain](#)

Nosso estudo evidenciou um diagnóstico tardio, e prejudicial ao tratamento. Atribui-se a este fato a semelhança dos sintomas com outras patologias e a ausência da testagem neonatal.

Observou-se também uma possível subnotificação de casos na MPS III B, pois além de ser muito rara, uma nova mutação foi descrita em 3 pacientes sem consanguinidade relatada: dois naturais de Abaetetuba e um de Belém. Sendo um heterozigoto, um homozigoto e um heterozigoto composto.

Na MPS II a nova Variante p.Q272X, foi identificada em 2 irmãos da etnia Munduruku (Aldeia Jacareacanga, Município de Itaituba, Pará). Sendo esta patologia com padrão de herança ligada ao cromossoma X, com a chance de transmissão de 50% em caso de nascimento de menino. Considerando a cultura indígena de casamentos consanguíneos, e considerando também que a população do estado do Pará apresenta elevada contribuição indígena, acredita-se que existe uma grande subnotificação de casos nesta população. Políticas de saúde apropriadas, respeitando os traços culturais destas populações, são importantes para as medidas de diagnóstico, tratamento e aconselhamento genético.

A sintomatologia apresentada pelos pacientes neste estudo é ampla e possui intensidade muito variada, porém está dentro do descrito em outros estudos.

Testes bioquímicos de triagem urinária (azul de toluidina e dosagem e cromatografia de GAG), foram efetivos tanto para o diagnóstico como para o acompanhamento dos pacientes. Já o teste de triagem urinária BCTMA, indicado na literatura como um indicador relacionado a MPS mostrou-se positivo em apenas 12% dos casos. Os testes enzimáticos (para cada subtipo de MPS), em plasma e leucócitos, tiveram 100% de assertividade, já os mesmos testes em SIPF, que não é a técnica padrão-ouro, porém em muitos casos é a única opção de amostra biológica devido a dificuldades geográficas, mostrou-se efetivo em 99% dos casos. Acreditamos

que considerando a extensão geográfica do nosso país e a dificuldade de acesso a inúmeras regiões, seria de grande importância investir em padronização de técnicas em SIPF e UIPF, para facilitar e ampliar o diagnóstico.

A avaliação molecular é fundamental para prever o curso da doença e para o aconselhamento genético, porém devido a raridade da doença a relação genótipo-fenótipo é prejudicada, uma vez que a alta variabilidade clínica muitas vezes em apresentações diferentes para o mesmo genótipo dificulta a obtenção de um padrão confiável.

A TRE mostrou-se efetiva em todos os pacientes a ela submetidos, retardando o curso natural da doença e melhorando alguns sintomas, porém ainda não contempla todos os tipos e subtipos da doença, seu desempenho endovenoso não é muito eficaz nas complicações osteomusculares e não é eficaz no SNC. Além da dificuldade de acesso aos centros de terapia no Estado do Pará, outro ponto levantado neste trabalho, ainda não relatado por outras literaturas em MPS, foi a dificuldade de acesso venoso para a aplicação das infusões. Sendo estas semanais, o acesso endovenoso passa a ser cada vez mais difícil e desconfortável para o paciente. Como em outras terapias endovenosas prolongadas, o implante de cateter totalmente implantado (Port-A-Cath) é uma opção a ser considerada.

As MPS têm apresentação clínica multissistêmica, necessitando, portanto, de um acompanhamento multidisciplinar, tanto para os pacientes como também para os familiares que tendo que enfrentar essa condição rara e permanente, muitas vezes deixam de lado o seu bem-estar priorizando o ente querido e muitas vezes adoecendo.

Contudo, observamos que o diagnóstico e tratamento adequado no estado do Pará ainda está muito distante de atender as necessidades reais da população e que ações de divulgação em todas as mídias possíveis e a conscientização, orientação e treinamento do maior público possível da área de saúde é um trabalho urgente e fundamental para que possamos diminuir a subnotificação de casos e levar tratamento adequado aos pacientes com MPS.

REFERÊNCIAS

- Abreu NJ, Selvaraj B, Truxal KV, Moore-Clingenpeel M, Zumberge NA, McNally KA, McBride KL, Ho ML, Flanigan KM. Longitudinal MRI brain volume changes over one year in children with mucopolysaccharidosis types IIIA and IIIB. **Mol Genet Metab.** 2021 Jun;133(2):193-200. doi: 10.1016/j.ymgme.2021.04.006. Epub 2021 Apr 27. PMID: 33962822.
- AKYOL, Mehmet Umut. *et al.* Recommendations for the management of MPS VI: systematic evidence- and consensus-based guidance. **Orphanet Journal of Rare Diseases**, [s. l.], v. 14, n. 118, p. 1-21, May 2019. Disponível em: <https://ojrd.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13023-019-1080-y>. Acesso em: 29 maio 2023.
- ALBERTS, B. *et al.* **Biologia molecular da célula**. 4. ed. São Paulo: Artmed, 2004. 1584 p.
- Alif N, Hess K, Straczek J, Sebbar S, N'Bou A, Nabet P, Dousset B. Mucopolissacaridose tipo I: caracterização de uma mutação comum que causa a síndrome de Hurler em indivíduos marroquinos. **Ann Hum Genet.** 1999; 63 :9–16. doi: 10.1046/j.1469-1809.1999.6310009.x.
- ALMÉCIGA-DIAZ, Carlos J. *et al.* Identification of ezetimibe and pranlukast as pharmacological chaperones for the treatment of the rare disease mucopolysaccharidosis type IVA. **J. Med. Chem.**, [Washington, DC], v. 62, n. 13, p. 6175-6189, July. 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31188588/>. Acesso em: 29 maio 2023.
- ALVES, S. *et al.* Molecular characterization of portuguese patients with mucopolysaccharidosis type II shows evidence that the IDS gene is prone to splicing mutations. **J. Inherit. Metab. Dis.**, [s. l.], v. 29, n. 6, p. 743-754, Dec. 2006. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17063374/>. Acesso em: 29 maio 2023.
- AMARTINO, H. *et al.* Identification of 17 novel mutations in 40 Argentinean unrelated families with mucopolysaccharidosis type II (Hunter syndrome). **Mol. Genet. Metab. reports** 2014, 1, 401–406.
- AUCLAIR, Dyane. *et al.* An overview of intra-articular therapy for mucopolysaccharidosis VI. **J. Pediatr. Rehabil. Med.**, [s. l.], v. 3, n. 1, p. 3-6, 2010. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21791826/>. Acesso em: 29 maio 2023.
- BAGEWADI, S. *et al.* Home treatment with elaprase and naglazyme is safe in patients with mucopolysaccharidoses types II and VI, respectively. **J. Inherit. Metab. Dis.**, [s. l.], v. 31, n. 6, p. 733-737, Dec. 2008. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18923918/>. Acesso em: 29 maio 2023.

BAK, Rasmus O; GOMEZ-OSPINA, Natalia; PORTEUS, Matthew H. Gene editing on center stage. **Trends Genet.**, [s. l.], v. 34, n. 8, p. :600-611, Aug. 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29908711/>. Acesso em: 29 maio 2023.

BARONE R., PELLICO A., PITTALÀ A., GASPERINI S. Neurobehavioral phenotypes of neuronopathic mucopolysaccharidoses. **Ital. J. Pediatr.** 2018;44:121. doi: 10.1186/s13052-018-0561-2.

BEARD, Helen. *et al.* Determination of the role of injection site on the efficacy of intra-CSF enzyme replacement therapy in MPS IIIA mice. **Mol. Genet. Metab.**, [s. l.], v. 115, n. 1, p. 33-40, May 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25795516/>. Acesso em: 29 maio 2023.

BECK, Michael. New therapeutic options for lysosomal storage disorders: enzyme replacement, small molecules and gene therapy. **Hum. Genet.**, [s. l.], v. 121, n. 1, p. 1–22, Mar. 2007. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17089160/>. Acesso em: 29 maio 2023.

BECK M *et al.* A história natural da MPS I: perspectivas globais do registro da MPS I. **Genet. Med.** 2014; 16 :759–765. doi: 10.1038/gim.2014.25.

BEESELEY, C. E. *et al.* Identification of 12 novel mutations in the alpha-N-acetylglucosaminidase gene in 14 patients with sanfilippo syndrome type B (mucopolysaccharidosis type IIIB). **J. Med. Genet.**, [s. l.], v. 35, n. 11, p. 910-914, Nov. 1998. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9832037/>. Acesso em: 29 maio 2023.

BIE H. *et al.* Insights into mucopolysaccharidosis I from the structure and action of α -L-iduronidase. **Nat Chem Biol.** 2013 Nov;9(11):739-45. doi: 10.1038/nchembio.1357. Epub 2013 Sep 11. Erratum in: Nat Chem Biol. 2013 Nov;9(11):746. PMID: 24036510; PMCID: PMC4954775.

BITENCOURT, F. H. de; SCHWARTZ, I. V. D.; VIANNA, F. S. L. Infant mortality in Brazil attributable to inborn errors of metabolism associated with sudden death: a time-series study (2002–2014). **BMC Pediatr.**, [s. l.], v. 19, n. 52, p. 1–8, Feb. 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30736757/>. Acesso em: 29 maio 2023.

BODAMER, Olaf A.; GIUGLIANI; Roberto; WOOD, Tim. The laboratory diagnosis of mucopolysaccharidosis III (Sanfilippo syndrome): a changing landscape. **Mol. Genet. Metab.**, [s. l.], v. 113, n. 1/2, p. 34-41, Sept./Oct. 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25127543/>. Acesso em: 30 maio 2023.

BORGES, Pâmella. *et al.* Estimated prevalence of mucopolysaccharidoses from population-based exomes and genomes. **Orphanet Journal of Rare Diseases**, [s. l.], v. 15, n. 324, p. 1-9, Nov. 2020. Disponível em: <https://ojrd.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13023-020-01608-0>. Acesso em: 29 maio 2023.

BOY, Raquel; SCHWARTZ, I. V. D. Às doenças lisossômicas e tratamento das mucopolissacaridoses. **Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto**, [Rio de Janeiro], v. 10, p. 61-72, ago./dez. 2011. Supl. 2. Disponível em: <https://bjhbs.hupe.uerj.br/?handler=artigo&id=107>. Acesso em: 29 maio 2023.

BUIST, N. R. Set of simple side-room urine tests for detection of inborn errors of metabolism. **Br. Med. J.**, [s. l.], v. 2, n. 5607, p. 745–749, June 1968. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1991639/>. Acesso em: 29 maio 2023.

BUNGE, S. *et al.* Identification of 31 novel mutations in the N-acetylgalactosamine-6-sulfatase gene reveals excessive allelic heterogeneity among patients with Morquio A syndrome. **Hum. Mutat.**, [s. l.], v. 10, n. 3, p. 223-232, 1997. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9298823/>. Acesso em: 29 maio 2023.

BUNGE, S. *et al.* Genotype-phenotype correlations in mucopolysaccharidosis type I using enzyme kinetics, immunoquantification and in vitro turnover studies. **Biochim Biophys Acta**. 1998 Sep 30;1407(3):249-56. doi: 10.1016/s0925-4439(98)00046-5. PMID: 9748610.

BRASIL. Lei nº 14.154, de 26 de maio de 2021. altera a lei nº 8.069, de 13 de julho de 1990 (estatuto da criança e do adolescente), para aperfeiçoar o programa nacional de triagem neonatal (pntn), por meio do estabelecimento de rol mínimo de doenças a serem rastreadas pelo teste do pezinho; e dá outras providências. **Diário Oficial da União**: seção 1, Brasília, DF, n. 99, p. 1, 27 maio 2021. Disponível em: <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/lei-n-14.154-de-26-de-maio-de-2021-322209993>. Acesso em: 02 jun. 2023.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Portaria nº 199, de 30 de janeiro de 2014**. Institui a Política Nacional de Atenção Integral às Pessoas com Doenças Raras, aprova as Diretrizes para Atenção Integral às Pessoas com Doenças Raras no âmbito do Sistema Único de Saúde (SUS) e institui incentivos financeiros de custeio. Brasília, DF. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2014/prt0199_30_01_2014.html. Acesso em: 02 jun. 2023

BRAVO. *et al.* Investigation of newborns with abnormal results in a newborn screening program for four lysosomal storage diseases in Brazil. **Mol. Genet. Metab. reports** 2017, 12, 92–97.

BREIER AC, Cé J, COELHO JC. Correlation of the levels of glycosaminoglycans between urine and dried urine in filter paper samples and their stability over time under different storage temperatures. **Clin Chim Acta**. 2014 Jun 10;433:49-53. doi: 10.1016/j.cca.2014.02.022. Epub 2014 Mar 5. PMID: 24613516.

BRUNI, Stefano; LAVERY, Christine; BROOMFIELD, Alexander. The diagnostic journey of patients with mucopolysaccharidosis I: a real-world survey of patient and physician experiences. **Mol. Genet. Metab. Rep.**, [s. l.], v. 8, p. 67–73, Sept. 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27536552/>. Acesso em: 29 maio 2023.

BRUSIUS-FACCHIN, Ana Carolina. *et al.* Recent advances in molecular testing to improve early diagnosis in children with mucopolysaccharidoses. **Expert Rev. Mol. Diagn.**, [s. l.], v. 18, n. 10, p. 855-866, Sept. 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30222014/>. Acesso em: 29 maio 2023.

BUERMANS HP. *et al.* Next generation sequencing technology: Advances and applications. **Biochim Biophys Acta**. 2014 Oct;1842(10):1932-1941. doi: 10.1016/j.bbadis.2014.06.015. Epub 2014 Jul 1. PMID: 24995601.

BUNGE S. *et al.* Mucopolysaccharidosis type I: identification of 8 novel mutations and determination of the frequency of the two common alpha-L-iduronidase mutations (W402X and Q70X) among European patients. **Hum Mol Genet**. 1994 Jun;3(6):861-6. doi: 10.1093/hmg/3.6.861. PMID: 7951228.

CACIOTTI, Anna. *et al.* Optimizing the molecular diagnosis of GALNS: novel methods to define and characterize Morquio-A syndrome-associated mutations. **Hum. Mutat.**, [s. l.], v. 36, n. 3, p. 357-368, Mar. 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25545067/>. Acesso em: 29 maio 2023.

CANALS, I. *et al.* Molecular analysis of Sanfilippo syndrome type C in Spain: seven novel HGSNAT mutations and characterization of the mutant alleles. **Clin. Genet.**, [s. l.], v. 80, n. 4, p. 367-374, Oct. 2011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20825431/>. Acesso em: 29 maio 2023.

CAPPELLETTI R, DEL Rosso M, CHIARRUGI VP. A new eletrophoretic method for complete separation of all known animal glycosaminoglycans in a monodimension run. **Anal. Biochem**. 1979; 99:311-315.

CAPUOZZO, Antonella. *et al.* Fluoxetine ameliorates mucopolysaccharidosis type IIIA. **Mol. Ther.**, [s. l.], v. 30, n. 4, p. 1432-1450, Apr. 2022. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35121108/>. Acesso em: 29 maio 2023.

CASTRO, Nathália Santos Serrão de. *et al.* Estimativa do perfil epidemiológico das mucopolissacaridoses no Estado do Pará = Epidemiological profile of mucopolysaccharidoses in the Para State, Brazil. **Pediatr. mod.**, [s. l.], v. 34, n. 1, p. 23 -28, jan./fev. 2007.

CAVALEIRO, Rosely Maria dos Santos. *et al.* Dentomaxillofacial manifestations of mucopolysaccharidosis VI: clinical and imaging findings from two cases, with an emphasis on the temporomandibular joint. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol.**, [s. l.], v. 116, n. 2, p. 141-148, Aug. 2013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23849382/>. Acesso em: 30 maio 2023.

CELIK, Betul. *et al.* Epidemiology of Mucopolysaccharidoses Update. **Diagnostics**, [s. l.], v. 11, n. 2, p. 1-37, Feb. 2021. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2075-4418/11/2/273>. Acesso em: 30 maio 2023.

CHEN, Xueru. *et al.* Demographic characteristics and distribution of lysosomal storage disorder subtypes in Eastern China. **J. Hum. Genet.**, [s. l.], v. 61, n. [4], p.

345–349, Apr. 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26740238/>. Acesso em: 30 maio 2023.

CHINEN, Yasutsugu. *et al.* Sanfilippo type B syndrome: five patients with an R565P homozygous mutation in the alpha-N-acetylglucosaminidase gene from the Okinawa islands in Japan. **J. Hum. Genet.**, [s. l.], v. 50, n. [7], p. 357–359, July 2005. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15933803/>. Acesso em: 30 maio 2023.

CHIONG MA, CANSON DM, ABACAN MA, BALUYOT MM, CORDERO CP, SILAO CL. Clinical, biochemical and molecular characteristics of Filipino patients with mucopolysaccharidosis type II - Hunter syndrome. **Orphanet J Rare Dis.** 2017 Jan 11;12(1):7. doi: 10.1186/s13023-016-0558-0. PMID: 28077157; PMCID: PMC5225557.

CHRISTENSEN, Chloe L. *et al.* Cell and Gene Therapies for Mucopolysaccharidoses: base editing and therapeutic delivery to the CNS. **Diseases**, [s. l.], v. 7, n. [3], p. 1–27, June 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6787741/>. Acesso em: 30 maio 2023.

CLARKE, Lorne A. *et al.* Genotype-phenotype relationships in mucopolysaccharidosis type I (MPS I): Insights from the International MPS I Registry. **Clin. Genet.**, [s. l.], v. 96, n. 4, p. 281–289, Oct. 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6852151/>. Acesso em: 30 maio 2023.

CLARKE, Lorne A. The mucopolysaccharidoses: a success of molecular medicine. **Expert Rev. Mol. Med.**, [s. l.], v. 10, Jan. 2008. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18201392/>. Acesso em: 30 maio 2023.

CLEARY, M. A. WRAITH, J. E. Management of mucopolysaccharidosis type III. **Arch. Dis. Child.**, [s. l.], v. 69, n. 3, p. 403–406, Sept. 1993. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1029535/>. Acesso em: 30 maio 2023.

COHN, Gabriel M.; MORIN, Isabelle; Whiteman, David A. H. Development of a mnemonic screening tool for identifying subjects with Hunter syndrome. **Eur. J. Pediatr.**, [s. l.], v. 172, n. [7], p. :965–970, July 2013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23468122/>. Acesso em: 30 maio 2023.

COUTINHO, M. F. *et al.* Molecular characterization of Portuguese patients with mucopolysaccharidosis IIIC: two novel mutations in the HGSNAT gene. **Clin. Genet.**, [s. l.], v. 74, n. 2, p. 194–195, Aug. 2008. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18518886/>. Acesso em: 30 maio 2023.

COUTINHO, Maria Francisca; LACERDA, Lucia; ALVES, Sandra. Glycosaminoglycan storage disorders: a review. **Biochemistry research international**, v. 2012, 2012.

CUDRY S. *et al.* MPS II in females: molecular basis of two different cases. **J Med Genet** 2000, 37:E29.

CYSKE Z. *et al.* Sanfilippo Syndrome: Optimizing Care with a Multidisciplinary Approach. **J Multidiscip Healthc.** 2022 Sep 19;15:2097-2110. doi: 10.2147/JMDH.S362994.

CROTTY, Paul L. *et al.* Mutation R468W of the iduronate-2-sulfatase gene in mild Hunter syndrome (mucopolysaccharidosis type II) confirmed by in vitro mutagenesis and expression. **Human molecular genetics**, v. 1, n. 9, p. 755-757, 1992.

DAMACENA, D. E. L., PEREIRA, D. A., VIDAL, D. A. S., & FARIAS, M. D. S. B. O cuidado de enfermagem e o port-a-cath ou cateter totalmente implantado em pacientes oncológicos: uma revisão da literatura. **Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research** [Internet], 2020. 30(2), 83-5.

DATTA, Priyanka. *et al.* A Case of Sanfillippo's Disease Correlating Clinical and Biochemical Findings. **Indian J. Clin. Biochem.**, [s. l.], v. 29, n. 4, p. 520–523, Oct./Dec. 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4175692/>. Acesso em: 30 maio 2023.

DE JONG, J. G. *et al.* Dimethylmethylene blue-based spectrophotometry of glycosaminoglicans in untreated urine: a rapid screening procedure for mucopolysaccharidoses. **Clin. Chem.**, v. 35, n. 7, p. 1472 - 1477, 1989.

DE RU, M.H. *et al.* Enzyme replacement therapy and/or hematopoietic stem cell transplantation at diagnosis in patients with mucopolysaccharidosis type I: results of a European consensus procedure. *Orphanet J Rare Dis* 6, 55 (2011). <https://doi.org/10.1186/1750-1172-6-55>

DEMIS, Alexandros Agron. *et al.* Double valve replacement in a patient with Maroteaux - Lamy syndrome as an ultimate team challenge. **J. Cardiothorac. Surg.**, [s. l.], v. 16, n. 141, p. 1–4, May 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34030701/>. Acesso em: 30 maio 2023.

DICK, T. Práticas de bioquímica. Porto Alegre: **Instituto de Pesquisas Bioquímicas**. 1970.

DONATI MA, PASQUINI E., SPADA M., POLO G., BURLINA A. Triagem neonatal em mucopolissacaridoses 11 Ciências Médicas e da Saúde 1114 Pediatria e Medicina Reprodutiva. **Itália. J. Pediatr.** 2018; 44 :226.

DÜNG VC, Tomatsu S, Montañó AM, Gottesman G, Bober MB, Mackenzie W, Maeda M, Mitchell GA, Suzuki Y, Orii T. Mucopolysaccharidosis IVA: correlation between genotype, phenotype and keratan sulfate levels. **Mol Genet Metab.** 2013 Sep-Oct;110(1-2):129-38. doi: 10.1016/j.ymgme.2013.06.008. Epub 2013 Jun 26. PMID: 23876334; PMCID: PMC3779837.

FAN, Xiaolian. *et al.* Identification of the gene encoding the enzyme deficient in mucopolysaccharidosis IIIC (Sanfilippo disease type C). **Am. J. Hum. Genet.**, [s. l.], v. 79, n. [4], p. 738-744, Oct. 2006. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16960811/>. Acesso em: 31 maio 2023.

FARAGUNA, Martha Caterina. *et al.* Mucopolysaccharidosis-Plus Syndrome, a Rapidly Progressive Disease: favorable impact of a very prolonged steroid treatment on the clinical course in a child. **Genes**, [s. l.], v. 13, n. 3, p. 1-10, Feb. 2022. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2073-4425/13/3/442>. Acesso em: 31 maio 2023.

FDA. Food and Drug Administration. FDA approval brings first gene therapy to the United States. August 30, 2017 Disponível em: <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approval-brings-first-gene-therapy-united-states>. Acesso em: 03/2023.

FEDELE, Anthony O. Sanfilippo syndrome: causes, consequences, and treatments. **Appl. Clin. Genet.**, [s. l.], v. 8, p. 269—281, Nov. 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26648750/>. Acesso em: 31 maio 2023.

FEDERHEN, Andressa. *et al.* Estimated birth prevalence of mucopolysaccharidoses in Brazil. **Am. J. Med. Genet. A.**, [s. l.], v. 182, n. 3, p. 469-483, Mar. 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31926052/>. Acesso em: 31 maio 2023.

FILOCAMO, Mirella. *et al.* Molecular analysis of 40 Italian patients with mucopolysaccharidosis type II: new mutations in the iduronate-2-sulfatase (IDS) gene. **Hum. Mutat.**, [s. l.], v. 18, n. 2, p. 87-167, Aug. 2001. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11462244/>. Acesso em: 31 maio 2023.

FOX, Joyce E. *et al.* First human treatment with investigational rhGUS enzyme replacement therapy in an advanced stage MPS VII patient. **Mol. Genet. Metab.**, [s. l.], v. 114, n. 2, p. 203-208, Feb. 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25468648/>. Acesso em: 31 maio 2023.

FRALDI, Alessandro. *et al.* Gene therapy for mucopolysaccharidoses: in vivo and ex vivo approaches. **Ital. J. Pediatr.**, [s. l.], v. 44, n. 130, p. 145–161, Nov. 2018. Suppl. 2. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6238250/>. Acesso em: 31 maio 2023.

FROISSART, Roseline; SILVA, Isabel Moreira da; Maire, Irène. Mucopolysaccharidosis type II: an update on mutation spectrum. **Acta Paediatr.**, [s. l.], v. 96, n. s455, p. 71-77, Apr. 2007. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17391447/>. Acesso em: 31 maio 2023.

FROISSART, Roseline. *et al.* Processing of iduronate 2-sulphatase in human fibroblasts. **Biochem. J.**, [s. l.], v. 309, n. [2], p. 425–430, July 1995. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1135749/>. Acesso em: 31 maio 2023.

FUJITSUKA, Honoka. *et al.* Biomarkers in patients with mucopolysaccharidosis type II and IV. **Molecular genetics and metabolism reports**, v. 19, p. 100455, 2019.

FURUJO, Mahoko; KOSUGA, Motomichi; OKUYAMA, Torayuki. Enzyme replacement therapy attenuates disease progression in two Japanese siblings with mucopolysaccharidosis type VI: 10-Year follow up. **Mol. Genet. Metab. Rep.**, [s. l.], v. 13, p. 69-75, Dec. 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28983456/>. Acesso em: 31 maio 2023.

GARCIA, Paula. *et al.* Long-term outcomes of patients with mucopolysaccharidosis VI treated with galsulfase enzyme replacement therapy since infancy. **Mol. Genet. Metab.**, [s. l.], v. 133, n. [1], p. 100-108, May 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33775523/>. Acesso em: 01 jun. 2023.

GARRIDO E, Cormand B, Hopwood JJ, Chabás A, Grinberg D, Vilageliu L. Maroteaux-Lamy syndrome: functional characterization of pathogenic mutations and polymorphisms in the arylsulfatase B gene. **Mol Genet Metab.** 2008 Jul;94(3):305-12. doi: 10.1016/j.ymgme.2008.02.012. Epub 2008 Apr 10. PMID: 18406185.

GARRIDO, Elena. *et al.* Identification of the molecular defects in Spanish and Argentinian mucopolysaccharidosis VI (Maroteaux-Lamy syndrome) patients, including 9 novel mutations. **Mol. Genet. Metab.**, [s. l.], v. 92, n. 1/2, p. 122-130, Sep./Oct. 2007. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17643332/>. Acesso em: 01 jun. 2023.

GATTI, R. *et al.* Mutations among Italian mucopolysaccharidosis type I patients. **J. Inherit. Metab. Dis.**, [s. l.], v. 20, n. 6, p. 803-806, Nov. 1997. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9427149/>. Acesso em: 01 jun. 2023.

GERMAIN, D. P. FAN, J.-Q. Pharmacological chaperone therapy by active-site-specific chaperones in Fabry disease: in vitro and preclinical studies. **Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.**, [s. l.], v. 47, p. 111 - 117, 2009. Suppl. 1. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20040321/>. Acesso em: 31 maio 2023.

GIRALDO GA, Ayala-Ramírez P, Prieto JC, García-Robles R, Acosta JC. Molecular findings of Colombian patients with type VI mucopolysaccharidosis (Maroteaux-Lamy syndrome). **Meta Gene.** 2015 Dec 23;7:83-9. doi: 10.1016/j.mgene.2015.12.004. PMID: 26909334; PMCID: PMC4733218.

GIUGLIANI, Roberto. *et al.* Mucopolysaccharidosis VII in Brazil: natural history and clinical findings. **Orphanet J. Rare Dis.**, [s. l.], v. 16, n. 238, p. 1-9, May 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34022924/>. Acesso em: 01 jun. 2023.

GIUGLIANI, Roberto. *et al.* Neurological manifestations of lysosomal disorders and emerging therapies targeting the CNS. **Lancet Child Adolesc. Health**, [s. l.], v. 2, n. 1, p. 56-68, Jan. 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30169196/>. Acesso em: 01 jun. 2023.

GIUGLIANI, Roberto. *et al.* Relative frequency and estimated minimal frequency of Lysosomal Storage Diseases in Brazil: Report from a Reference Laboratory. **Genet. Mol. Biol.** 2017, 40, 31–39.

GIUGLIANI, Roberto. *et al.* Current molecular genetics strategies for the diagnosis of lysosomal storage disorders. **Expert. Rev. Mol. Diagn.**, [s. l.], v. 16, n. 1, p. 113-123, 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26567866/>. Acesso em: 01 jun. 2023.

GIUGLIANI, Roberto. Mucopolysaccharidoses: From understanding to treatment, a century of discoveries. **Genet. Mol. Biol.**, Brazil, v. 35, n. 4, p. 924-931, 2012. Suppl. 1. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/gmb/a/KmmhS5tVnmC6qBQb5vbG4hs/?lang=en>. Acesso em: 01 jun. 2023.

GIUGLIANI, Roberto. *et al.* Terapia de reposição enzimática para as mucopolissacaridoses I, II e VI: recomendações de um grupo de especialistas brasileiros. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, [s. l.], v. 56, n. 3, p. 257-77, ago. 2010. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/ramb/a/XmmsZknpHMYqRZmKXQGsMwS/?lang=pt>. Acesso em: 01 jun. 2023.

GÖKDOĞAN, Çağıl. *et al.* Audiologic evaluations of children with mucopolysaccharidosis. **Braz. J. Otorhinolaryngol.**, [s. l.], v. 82, n. 3, p. 281-284, May/June 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26601996/>. Acesso em: 01 jun. 2023.

GORT, Laura; CHABÁS, Amparo; COLL, M. Josep. Analysis of five mutations in 20 mucopolysaccharidosis type I patients: high prevalence of the W402X mutation. **Hum. Mutat.**, [s. l.], v. 11, n. 4, p. 332-333, 1998. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10215409/>. Acesso em: 01 jun. 2023.

GROVER, Anita. *et al.* Translational studies of intravenous and intracerebroventricular routes of administration for CNS cellular biodistribution for BMN 250, an enzyme replacement therapy for the treatment of Sanfilippo type B. **Drug Deliv. Transl. Res.**, [s. l.], v. 10, n. [2], p. 425–439, 2020. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7066106/>. Acesso em: 01 jun. 2023.

GUARANY, Nicole Ruas. **Avaliação do efeito da terapia de reposição enzimática na capacidade funcional de pacientes com mucopolissacaridose**. 2011. 120 f. Dissertação (Mestrado em Saúde da Criança e do Adolescente) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre/RS, 2011. Disponível em: <https://lume.ufrgs.br/handle/10183/31815>. Acesso em: 01 jun. 2023.

GUFFON, Nathalie. *et al.* Understanding the challenges, unmet needs, and expectations of mucopolysaccharidoses I, II and VI patients and their caregivers in France: a survey study. **Orphanet J. Rare Dis.**, [s. l.], v. 17, n. 448, p. 1–12, Dec. 2022. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36564803/>. Acesso em: 01 jun. 2023.

GULLEBART N., AMARTINO H., ARBERAS C. Guia para o diagnóstico, acompanhamento e tratamento da mucopolissacaridose tipo II (MPS-II) ou doença de Hunter. **Pediatra Argent.** 2011;2:175-81.

GRUBER K. Europe gives gene therapy the green light. **Lancet**. 2012;380:e10.
HAMPE, Christiane S. *et al.* Mucopolysaccharidosis Type I: Current Treatments, Limitations, and Prospects for Improvement. **Biomolecules**, [s. l.], v. 11, n. 2, p. 1–24, Jan. 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33572941/>. Acesso em: 01 jun. 2023.

HAMPE, Christiane S. *et al.* Differences in MPS I and MPS II Disease Manifestations. **Int. J. Mol. Sci.**, [s. l.], v. 22, n. 15, p. 1–25, July 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34360653/>. Acesso em: 01 jun. 2023.

HANKA VENSELAAR, Tim AH; BEEK, Remko KP; KUIPERS, Maarten L. Hekkelman. Gert Vriend. Protein structure analysis of mutations causing inheritable diseases. An e-Science approach with life scientist friendly interfaces. **BMC Bioinformatics**, v. 11, p. 548, 2010. PMID: 21059217.

HARMATZ, Paul. *et al.* The effect of galsulfase enzyme replacement therapy on the growth of patients with mucopolysaccharidosis VI (Maroteaux-Lamy syndrome). **Mol. Genet. Metab.**, [s. l.], v. 122, n. 1/2, p. 107-112, Sept. 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28457718/>. Acesso em: 02 jun. 2023.

HARMATZ, Paul. *et al.* Long-term follow-up of endurance and safety outcomes during enzyme replacement therapy for mucopolysaccharidosis VI: Final results of three clinical studies of recombinant human N-acetylgalactosamine 4-sulfatase. **Mol Genet Metab**. 2008;94(4):469-75.

HARMATZ, Paul. *et al.* Direct comparison of measures of endurance, mobility, and joint function during enzyme-replacement therapy of mucopolysaccharidosis VI (Maroteaux-Lamy syndrome): results after 48 weeks in a phase 2 open-label clinical study of recombinant human N-acetylgalactosamine 4-sulfatase. **Pediatrics**, [s. l.], v. 115, n. 6, p. 681–689, June 2005. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15930196/>. Acesso em: 02 jun. 2023.

HARTL, F. Ulrich; HAYER-HARTL, Manajit. Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. **Science**, [s. l.], v. 295, n. 5561, p. 1852-1858, Mar. 2022. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11884745/>. Acesso em: 02 jun. 2023.

HARTL, F. Ulrich; BRACHER, Andreas; HAYER-HARTL, Manajit. Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. **Nature**, [s. l.], v. 475, n. [7356], p. 324–332, July 2011. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nature10317>. Acesso em: 02 jun. 2023

HASHIMOTO, Ayako; KUMAGAI, Tadayuki; MINETA, Hiroyuki. Hunter Syndrome Diagnosed by Otorhinolaryngologist. **Case Rep. Otolaryngol.**, [s. l.], v. 2018, p. 1–4, May 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5971261/>. Acesso em: 02 jun. 2023.

HOBBS, J R. Bone marrow transplantation for inborn errors. **Lancet**, [s. l.], v. 318, n. 8249, p. 735-739, Oct. 1981. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6116868/>. Acesso em: 02 jun. 2023.

HGMD - Human Gene Mutation Database. Disponível em <https://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>. Acesso em fevereiro de 2023.

HREBÍCEK, Martin. *et al.* Mutations in TMEM76* cause mucopolysaccharidosis IIIC (Sanfilippo C syndrome). **Am. J. Hum. Genet.**, [s. l.], v. 79, n. [5], p. 807-819, Nov. 2006. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17033958/>. Acesso em: 02 jun. 2023.

ISOGAI, K. *et al.* Mutation analysis in the iduronate-2-sulphatase gene in 43 Japanese patients with mucopolysaccharidosis type II (Hunter disease). **J. Inherit. Metab. Dis.**, [s. l.], v. 21, n. 1, p. 60-70, Feb. 1998. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9501270/>. Acesso em: 02 jun. 2023.

JIMÉNEZ-ARREDONDO RE. *et al.* Associação entre anomalias estruturais cerebrais, eletroencefalograma e história das convulsões na Mucopolissacaridose tipo II (síndrome de Hunter) **Neurol. ciência** 2017; 38 :445–450. doi: 10.1007/s10072-016-2788-2.

JIN, Ping. *et al.* A 3' splice site mutation of IDS gene in a Chinese family with mucopolysaccharidosis type II. **Gene**, v. 528, n. 2, p. 236-240, 2013.

JONES, Simon A. *et al.* A phase 1/2 study of intrathecal heparan-N-sulfatase in patients with mucopolysaccharidosis IIIA. **Mol. Genet. Metab.**, [s. l.], v. 118, n. [3], p. 198-205, July 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27211612/>. Acesso em: 02 jun. 2023.

JOSAHKIAN, Juliana Alves. *et al.* Updated birth prevalence and relative frequency of mucopolysaccharidoses across Brazilian regions. **Genet. Mol. Biol.**, [s. l.], v. 44, n. 1, p. 1-6, 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33503199/>. Acesso em: 02 jun. 2023.

JOSAHKIAN, J. A. . *et al.* Genotype-phenotype studies in a large cohort of Brazilian patients with Hunter syndrome. *American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics*, v. 187, p. 349-356, 2021.

KAKKIS, Emil D. *et al.* Enzyme-replacement therapy in mucopolysaccharidosis I. **N. Engl. J. Med.**, [s. l.], v. 344, n. 3, p. 182-188, Jan. 2001. Disponível em: <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJM200101183440304>. Acesso em: 02 jun. 2023.

KAMEI, M. *et al.* Aminoglycoside-induced premature stop codon read-through of mucopolysaccharidosis type i patient Q70X and W402X mutations in cultured cells. **JIMD Reports** 2014, 13, 139–147.

KARAGEORGOS, Litsa. *et al.* Mutational analysis of mucopolysaccharidosis type VI patients undergoing a phase II trial of enzyme replacement therapy. **Mol. Genet. Metab.**, [s. l.], v. 90, n. 2, p. 164-170, Feb. 2007. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17161971/>. Acesso em: 02 jun. 2023.

KARAGEORGOS, Litsa. *et al.* Mutational analysis of 105 mucopolysaccharidosis type VI patients. **Hum Mutat.** 2007 Sep;28(9):897-903. doi: 10.1002/humu.20534. PMID: 17458871.

KATO, Z., Fukuda, S., Tomatsu, S. *et al.* Uma nova mutação missense comum G301C no gene da N-acetilgalactosamina-6-sulfato sulfatase na mucopolissacaridose IVA. **Hum Genet** 101 , 97-101 (1997). <https://doi.org/10.1007/s004390050594>

KATO T., Kato Z., Kuratsubo I., Tanaka N., Ishigami T., Kajihara J., Sukegawa-Hayasaka K., Orii K., Isogai K., Fukao T., *et al.* Análise mutacional e estrutural de pacientes japoneses com mucopolissacaridose tipo II. **J. Hum. Genet.** 2005; 50 :395–402. doi: 10.1007/s10038-005-0266-4.

KHAN, Shaukat A. *et al.* Epidemiology of mucopolysaccharidoses. **Mol. Genet. Metab.**, [s. l.], v. 121, n. 3, p. 227-240, July 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28595941/>. Acesso em: 02 jun. 2023.

KHANGURA, Sara D. *et al.* Child and family experiences with inborn errors of metabolism: a qualitative interview study with representatives of patient groups. **J. Inherit. Metab. Dis.**, [s. l.], v. 39, n. 1, p. 139–147, Jan. 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4710640/>. Acesso em: 02 jun. 2023.

KINGMA SD. *Et al.* An algorithm to predict phenotypic severity in mucopolysaccharidosis type I in the first month of life. *Orphanet J Rare Dis.* 2013 Jul 9;8:99. doi: 10.1186/1750-1172-8-99. PMID: 23837464; PMCID: PMC3710214.

KING, Barbara. *et al.* Slow, continuous enzyme replacement via spinal CSF in dogs with the paediatric-onset neurodegenerative disease, MPS IIIA. **J. Inherit. Metab. Dis.**, [s. l.], v. 40, n. 3, p. 443-453, May 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27832416/>. Acesso em: 02 jun. 2023.

KING, D. H.; JONES, R. M.; BARNETT, M. B. Anaesthetic considerations in the mucopolysaccharidoses. **Anaesthesia**, [s. l.], v. 39, n. [2], p. 126- 131, Feb. 1984. Disponível em: <https://associationofanaesthetists-publications.onlinelibrary.wiley.com/toc/13652044/1984/39/2>. Acesso em: 03 jun. 2023.

KINGMA SDK, JONCKHEERE AI. MPS I: Early diagnosis, bone disease and treatment, where are we now? **J Inherit Metab Dis.** 2021 Nov;44(6):1289-1310. doi: 10.1002/jimd.12431. Epub 2021 Sep 15. PMID: 34480380.

KIYKIM, Ertugrul. *et al.* Screening Mucopolysaccharidosis Type IX in Patients with Juvenile Idiopathic Arthritis. **JIMD Rep.**, [s. l.], v. 25, p. 21–24, [2016]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5059191/>. Acesso em: 03 jun. 2023.

KOWALEWSKI, Björn. *et al.* Arylsulfatase G inactivation causes loss of heparan sulfate 3-O-sulfatase activity and mucopolysaccharidosis in mice. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, [s. l.], v. 109, n. 26, p. 10310–10315, June 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22689975/>. Acesso em: 02 jun. 2023.

KRIVIT, William. Allogeneic stem cell transplantation for the treatment of lysosomal and peroxisomal metabolic diseases. **Springer Semin. Immunopathol.**, [s. l.], v. 26, n. 1/2, p. 119–132, Nov. 2004. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15452666/>. Acesso em: 02 jun. 2023.

KLEIN, U., VAN DE KAMP, JJP, VON FIGURA, K., POHLMANN, R. Sanfilippo síndrome tipo C: ensaio para acetil-CoA: alfa-glucosaminídeo N-acetiltransferase em leucócitos para detecção de indivíduos homozigotos e heterocigóticos. **Clin. Genet.** 20: 55-59, 1981. [PubMed: [6794963](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6794963/)]

KUBASKI, Francyne. *et al.* Diagnosis of Mucopolysaccharidoses. **Diagnostics (Basel)**. 2020 Mar 22;10(3):172. doi: 10.3390/diagnostics10030172. PMID: 32235807; PMCID: PMC7151013.

KUBASKI, Francyne. *et al.* Glycosaminoglycans detection methods: Applications of mass spectrometry. **Mol. Genet. Metab.**, [s. l.], v. 120, n. 1/2, p. 67-77, Jan./Feb. 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27746032/>. Acesso em: 03 jun. 2023.

KUIPER, Gé-Ann. *et al.* Failure to shorten the diagnostic delay in two ultra-orphan diseases (mucopolysaccharidosis types I and III): potential causes and implications. **Orphanet J. Rare Dis.**, [s. l.], v. 13, n. 2, p. 1–13, Jan. 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29310675/>. Acesso em: 03 jun. 2023.

KUNIN-BATSON, A. S. *et al.* Long-Term Cognitive and Functional Outcomes in Children with Mucopolysaccharidosis (MPS)-IH (Hurler Syndrome) Treated with Hematopoietic Cell Transplantation. **JIMD Rep.**, [s. l.], v. 29, p. 95–102, Jan. 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5059216/>. Acesso em: 03 jun. 2023.

LARADI S. *et al.* Mucopolissacaridose tipo I: identificação de 13 novas mutações no gene da alfa-Liduronidase. **J Herdar Metab Dis.** 2005; 28 :1019–1026. doi: 10.1007/s10545-005-0197-4.

LEHMAN TJ, MILLER N, NORQUIST B, UNDERHILL L, KEUTZER J. Diagnosis of the mucopolysaccharidoses. **Rheumatology (Oxford)**. 2011 Dec;50 Suppl 5:v41-8. doi: 10.1093/rheumatology/ker390. PMID: 22210670.

LEISTNER-SEGAL, S. *et al.* Fast and robust protocol for prenatal diagnosis of mucopolysaccharidosis type II |. **Clin. Biomed. Res.** 2014, 34, 371–373.

LI, H. H. *et al.* Mouse model of Sanfilipposyndrome type B produced by targeted disruption of the gene encoding α -N-acetylglucosaminidase. **Proc Natl Acad Sci., U S A**, v. 96, n. 25, p. 4505 - 14510, 1999.

LIANG, Y., GAO, X., LU, D. *et al.* Mucopolissacaridose tipo IIIC na China continental: características clínicas e moleculares de dez pacientes e relato de seis novas variantes no gene HGSNAT. **Metab Brain Dis** (2023). <https://doi.org/10.1007/s11011-023-01204-8>

LIN HY. *et al.* Identification and Functional Characterization of IDS Gene Mutations Underlying Taiwanese Hunter Syndrome (Mucopolysaccharidosis Type II). **Int J Mol Sci.** 2019 Dec 23;21(1):114. doi: 10.3390/ijms21010114. PMID: 31877959; PMCID: PMC6982257.

LIN, S. P. *et al.* Detection of Hunter syndrome (mucopolysaccharidosis type II) in Taiwanese: biochemical and linkage studies of the iduronate-2-sulphatase gene defects in MPS II patients and carriers. **Clin. Chim. Acta**, v. 369, n. 1, p. 29 - 34, 2006.

LIN, W. *et al.* Genetic analysis of mucopolysaccharidosis type VI in Taiwanese patients. **Clinica Chimica Acta**, n. 394, p. 89 – 93, 2008.

LITJENS, T. *et al.* Identification, expression, and biochemical characterization of N-acetylgalactosamine-4-sulfatase mutations and relationship with clinical phenotype in MPS-VI patients. **Am. J. Hum. Genet.**, n. 58, p. 1127 - 1134, 1996.

LOSADA DÍAZ, Juan Camilo. *et al.* Advances in the Development of Pharmacological Chaperones for the Mucopolysaccharidoses. **Int. J. Mol. Sci.**, [s. l.], v. 21, n. [1], p. 1–19, 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31905715/>. Acesso em: 03 jun. 2023.

LOWRY, Oliver H. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J biol Chem**, v. 193, p. 265-275, 1951.

LYSENG-WILLIAMSON, Katherine A. Elosulfase Alfa: a review of its use in patients with mucopolysaccharidosis type IVA (Morquio A syndrome). **BioDrugs**, [s. l.], v. 28, n. 5, p. 465–475, Sept. 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25200032/>. Acesso em: 03 jun. 2023.

MACEDO CG, *et al.* Complicações de cateteres totalmente implantáveis: a propósito de um caso clínico. **Angiol Cir Vasc**, Lisboa. 2015; 11(1):21-25.

MANGAS, M. Molecular analysis of mucopolysaccharidosis type IIIB in Portugal: evidence of a single origin for a common mutation (R234C) in the Iberian Peninsula. **Clin Genet.**, n. 73, p. 251 – 256, 2008.

MALM G, Mansson JE (2010) Mucopolysaccharidosis type III (Sanfilippo disease) in Sweden: clinical presentation of 22 children diagnosed during a 30-year period. **Acta Paediatr** 99:1253–1257.

MATTE, U. *et al.* Molecular Identification and characterization of 13 new mutations in mucopolysaccharidosis type I patients. **Genetics and Metabolism**, n. 78, p. 37 – 43, 2003.

MATSUHISA K., Imaizumi K. Loss of Function of Mutant IDS Due to Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation: New Therapeutic Opportunities for Mucopolysaccharidosis Type II. **Int. J. Mol. Sci.** 2021;22:12227. doi: 10.3390/ijms222212227

MARTIN, Rick. *et al.* Recognition and diagnosis of mucopolysaccharidosis II (Hunter syndrome). **Pediatrics**, [s. l.], v. 121, n. 2, p. 377–386, Feb. 2008. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18245410/>. Acesso em: 03 jun. 2023.

MARTINS C. *et al.* Molecular characterization of a large group of Mucopolysaccharidosis type IIIC patients reveals the evolutionary history of the disease. **Hum Mutat.** 2019 Aug;40(8):1084-1100. doi: 10.1002/humu.23752. Epub 2019 Jun 22. PMID: 31228227.

MARTINS AM. *et al.* Baixa estatura como sintoma de apresentação de mucopolissacaridose atenuada tipo I: relato de caso e insights clínicos. **BMC Endocr. Desordem.** 2018; 18:83 . doi: 10.1186/s12902-018-0311-x.

MARTINS AM, *et al.* Diretrizes para o manejo da mucopolissacaridose tipo I. **The Journal of Pediatrics.** 2009.

McBride KL, Flanigan KM. Update in the Mucopolysaccharidoses. **Semin Pediatr Neurol.** 2021 Apr;37:100874. doi: 10.1016/j.spen.2021.100874. Epub 2021 Feb 10. PMID: 33892850

MCCAFFERTY EH, Scott LJ. Vestronidase alfa: uma revisão em mucopolissacaridose VII. **Biomedicamentos.** 2019; 33 :233–240. doi: 10.1007/s40259-019-00344-7.

MEIJER OLM. *et al.* Residual N-acetyl- α -glucosaminidase activity in fibroblasts correlates with disease severity in patients with mucopolysaccharidosis type IIIB. **J Inherit Metab Dis.** 2016 May;39(3):437-445. doi: 10.1007/s10545-016-9916-2. Epub 2016 Feb 23. PMID: 26907177; PMCID: PMC4851702.

MEIKLE, P. J. *et al.* Prevalence of lysosomal storage diseases. **JAMA**, n. 28, p. 249 - 254, 1999.

MOISAN, L. *et al.* Características clínicas de pacientes de Quebec, Canadá, com síndrome de Morquio A: um estudo observacional longitudinal. **Orphanet Journal of Rare Diseases**, 2020 15 , 270. 10.1186/s13023-020-01545-y

MONTAÑO, Adriana M. *et al.* Clinical course of sly syndrome (mucopolysaccharidosis type VII). **J. Med. Genet.**, [s. l.], v. 53, n. [6], p. 403-418, 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26908836/>. Acesso em: 03 jun. 2023.

MORENO Giraldo LJ, Escudero Rodríguez ÁM, Sánchez Gómez A, Satizabal Soto JM. Clinical and molecular characteristics of colombian patients with mucopolysaccharidosis IVA, and description of a new galns gene mutation. **Mol Genet Metab Rep.** 2018 Jul 20;16:53-56. doi: 10.1016/j.ymgmr.2018.06.008.

MUENZER, Joseph. *et al.* Mucopolysaccharidosis I: management and treatment guidelines. **Pediatrics**, [s. l.], v. 123, n. 1, p. 19–29, Jan. 2009. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19117856/>. Acesso em: 03 jun. 2023.

MUENZER, Joseph. *et al.* Multidisciplinary management of Hunter Syndrome. **Pediatrics** (2009) Dec; 124(6) e1228-39

MUENZER, Joseph. The mucopolysaccharidoses: a heterogeneous group of disorders with variable pediatric presentations. **J. Pediatr.**, [s. l.], v. 144, p. 27-34, May 2004. Suppl. 5. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15126981/>. Acesso em: 03 jun. 2023.

MUNOZ-ROJAS, Maria-Veronica. *et al.* Intrathecal enzyme replacement therapy in a patient with mucopolysaccharidosis type I and symptomatic spinal cord compression. **Am. J. Med. Genet. A**, [s. l.], v. 146A, n. 19, p. 2538-2544, Oct. 2008. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18792977/>. Acesso em: 03 jun. 2023.

NAGPAL, Rohit. *et al.* Early enzyme replacement therapy prevents dental and craniofacial abnormalities in a mouse model of mucopolysaccharidosis type VI. **Front. Physiol.**, [s. l.], v. 13, p. 1-12, Sept. 2022. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36213247/>. Acesso em: 03 jun. 2023.

NAKASHIMA Y. *et al.* Mucopolissacaridose IV A: Clonagem molecular da N-acetilgalactosamina- Gene da 6-sulfatase (GALNS) e análise da região flanqueadora 5'. *Genômica*. 1994; 20 :99-104. doi: 10.1006/geno.1994.1132. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8020961/> Acesso em: 01 de jun. 2023.

NAN, Haiyan; PARK, Chanbum; MAENG, Sungho. Mucopolysaccharidoses I and II: Brief Review of Therapeutic Options and Supportive/Palliative Therapies. **Biomed Res. Int.**, [s. l.], v. 2020, p. 1-18, Dec. 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33344633/>. Acesso em: 03 jun. 2023.

NATOWICZ, M. R. Clinical and biochemical manifestations of hyaluronidase deficiency. **N Engl J Med.**, v. 335, n. 14, p.1029 – 1033, 1996.

NEVES, LARISSA MYRTES. Análise de glicosaminoglicanos urinários em pacientes portadores de mucopolissacaridoses com fins diagnósticos. CONGRESSO NACIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 15. **SEMESP.2015**. Ribeirão Preto. Disponível em: <https://conic-semesp.org.br/anais/files/2015/trabalho-1000019213.pdf>.

NEUFELD, E. F.; MUENZER. J. *In*: SCRIVER, Charles R. **The Online Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease**. 8th ed. New York: McGraw-Hill Medical, 2001.

NEVIN, Suzanne M. *et al.* The information needs of parents of children with early-onset epilepsy: A systematic review. **Epilepsy Behav.**, [s. l.], v. 112, Nov. 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32854014/>. Acesso em: 03 jun. 2023.

OKUYAMA, Torayuki. *et al.* Japan Elaprase Treatment (JET) study: idursulfase enzyme replacement therapy in adult patients with attenuated Hunter syndrome (Mucopolysaccharidosis II, MPS II). **Mol. Genet. Metab.**, [s. l.], v. 99, n. 1, p. 18-25, Jan. 2010. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19773189/>. Acesso em: 03 jun. 2023.

OMAR, A.; Jalil, J.A.; Shakrin, N.M.; Ngu, L.H.; Yunus, Z.M. Selective screening for detection of mucopolysaccharidoses in Malaysia; A two-year study (2014–2016). **Mol. Genet. Metab.** Reports 2019.

OMIN - Herança Mendeliana Online no Homem. MUCOPOLISACARIDOSE TIPO VII; MPS7 [Internet]. # 253220. 2020 [citado em 26 de agosto de 2020]. <https://omim.org/entry/253220>

PARDRIDGE, William M. Brain Delivery of Nanomedicines: Trojan Horse Liposomes for Plasmid DNA Gene Therapy of the Brain. **Front. Med. Technol.**, [s. l.], v. 2, p. 1-40, Nov. 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35047884/>. Acesso em: 03 jun. 2023.

PARENTI, Giancarlo. *et al.* New strategies for the treatment of lysosomal storage diseases (review). **Int. J. Mol. Med.**, [s. l.], v. 31, n. 1, p. 11-20, Jan. 2013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23165354/>. Acesso em: 03 jun. 2023.

PARINI R., Jones SA, Harmatz PR, Giugliani R., Mendelsohn NJ. A história natural do crescimento em pacientes com síndrome de Hunter: Dados do Hunter Outcome Survey (HOS) **Mol. Genet. Metab.** 2016; 117 :438–446. doi:10.1016/j.ymgme.2016.01.009

PASQUALIM, G. *et al.* p. L18P: a novel IDUA mutation that causes a distinct attenuated phenotype in mucopolysaccharidosis type I patients. **Clin. Genet.** 2015, 88, 376–380.

PEAKE R., BODAMER O. Triagem Neonatal para Distúrbios de Armazenamento Lisossomal. **J. Pediatr.** Genet. 2016; 06 :051–060. doi: 10.1055/s-0036-1593843.

PECK DS. *et al.* Incorporation of Second-Tier Biomarker Testing Improves the Specificity of Newborn Screening for Mucopolysaccharidosis Type I. **Int J Neonatal Screen.** 2020 Feb 7;6(1):10. doi: 10.3390/ijns6010010.

PENNOCK CA. A review and selection of simple laboratory methods used for the study of glycosaminoglycan and the diagnosis of the mucopolysaccharidoses. **J. Clin. Path.** 1976; 29:111-128.

PERACHA, Hira. *et al.* Molecular genetics and metabolism, special edition: Diagnosis, diagnosis and prognosis of Mucopolysaccharidosis IVA. **Mol. Genet. Metab.**, [s. l.], v. 125, n. 1/2, p. 18-37, Sept. 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29779902/>. Acesso em: 04 jun. 2023.

PETRY, M. F. G. *et al.* Mucopolysaccharidosis type VI: Identification of novel mutations on the arylsulphatase B gene in South American patients. **J. Inherit. Metab. Dis.**, [s. l.], v. 28, n. 6, p. 1027-1034, Dec. 2005. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16435196/>. Acesso em: 03 jun. 2023.

POLETTTO, Edina; BALDO, Guilherme; GOMEZ-OSPINA, Natalia. Genome Editing for Mucopolysaccharidoses. **Int. J. Mol. Sci.**, [s. l.], v. 21, n. [2], p. 1-20, Jan. 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31941077/>. Acesso em: 04 jun. 2023.

POLGREEN, Lynda E. *et al.* Pilot study of the safety and effect of adalimumab on pain, physical function, and musculoskeletal disease in mucopolysaccharidosis types I and II. **Mol. Genet. Metab. Rep.**, [s. l.], v. 10, p. 75-80, Mar. 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5238608/>. Acesso em: 04 jun. 2023.

POPOWSKA, Ewa *et al.* Mutations of the iduronate-2-sulfatase gene in 12 Polish. Patients with mucopolysaccharidosis type II (Hunter syndrome). **Human mutation**, v. 5, n. 1995.

Predicting functional effect of human missense mutations using PolyPhen-2. Adzhubei I, Jordan DM, Sunyaev SR. **Curr Protoc Hum Genet**. 2013 Jan; Chapter 7:Unit7.20. PMID: 23315928.

PRYDZ, K. ; DALEN, K. T. Synthesis and sorting of proteoglycans. **J. Cell. Sci.**, n. 113, p. 193 - 205, 2000.

PROVEAN web server: a tool to predict the functional effect of amino acid substitutions and indels. Choi Y, Chan AP. **Bioinformatics**. 2015 Aug 15;31(16):2745-7. PMID: 25851949.

REMONDINO, Rodrigo G. *et al.* Clinical Manifestations and Surgical Management of Spinal Lesions in Patients With Mucopolysaccharidosis: A Report of 52 Cases. **Spine deformity**, v. 7, n. 2, p. 298-303, 2019.

RIVERA-COLÓN Y, Schutsky EK, Kita AZ, Garman SC. The structure of human GALNS reveals the molecular basis for mucopolysaccharidosis IV A. **J Mol Biol**. 2012 Nov 9;423(5):736-51. doi: 10.1016/j.jmb.2012.08.020. Epub 2012 Aug 29.

RICHARDS S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, Grody WW, Hegde M, Lyon E, Spector E, Voelkerding K, Rehm HL; ACMG Laboratory Quality Assurance Committee. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. **Genet Med**. 2015 May;17(5):405-24. doi: 10.1038/gim.2015.30. Epub 2015 Mar 5.

RUIJTER GJ. *et al.* Clinical and genetic spectrum of Sanfilippo type C (MPS IIIC) disease in The Netherlands. **Mol Genet Metab**. 2008 Feb;93(2):104-11. doi: 10.1016/j.ymgme.2007.09.011.

SAFARY, Azam. *et al.* Targeted enzyme delivery systems in lysosomal disorders: an innovative form of therapy for mucopolysaccharidosis. **Cellular and Molecular Life Sciences**, p. 1-19, 2019.

SATO, Yuji; OKUYAMA, Torayuki. Novel Enzyme Replacement Therapies for Neuropathic Mucopolysaccharidoses. **Int. J. Mol. Sci.**, [s. l.], v. 21, n. [2], p. 1-12, Jan. 2020. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/21/2/400>. Acesso em: 04 jun. 2023.

SAWAMOTO, Kazuki. *et al.* Therapeutic Options for Mucopolysaccharidoses: Current and Emerging Treatments. **Drugs**, [s. l.], v. 79, n. 10, p. 1103–1134, July 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31209777/>. Acesso em: 04 jun. 2023.

SAWAMOTO, Kazuki. *et al.* Gene therapy for Mucopolysaccharidoses. **Mol Genet Metab.** 2018 Feb;123(2):59-68. doi: 10.1016/j.ymgme.2017.12.434

SAWKAR, Anu R. *et al.* Gaucher disease-associated glucocerebrosidases show mutation-dependent chemical chaperoning profiles. **Chem. Biol.**, [s. l.], v. 12, n. [11], p. 1235–1244, Nov. 2005. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16298303/>. Acesso em: 04 jun. 2023.

SCRIVER, C. R. *et al.* The metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease. 8. ed. **New York**: McGraw-Hill, Inc, 2001.

SCHWARTZ, I. V. *et al.* Mucopolissacaridoses. *In*: CARAKUSHANSKI, Gerson. **Doenças genéticas em pediatria**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. p. 180-184.

SCHWARTZ, I. V. D. *et al.* **MPS no Brasil: Estudos clínicos e Dados Epidemiológicos**. Porto Alegre, RS, 2002. Disponível em: <http://www.hcpa.ufrgs.br/genetica,genetica@hcpa.ufrgs.br>. Acesso em: 10 dez. 2020.

SCHWARZ, Jana Marie. *et al.* MutationTaster evaluates disease-causing potential of sequence alterations. **Nature methods**, v. 7, n. 8, p. 575-576, 2010.

SHAPIRO E., Eisengart J. A história natural da neurocognição nos distúrbios da MPS: uma revisão. **Mol. Genet. Metab.** 2021; 133 :8–34. doi: 10.1016/j.ymgme.2021.03.002.

SHIPLEY, JM. *et al.* Análise mutacional de um paciente com mucopolissacaridose tipo VII e identificação de pseudogenes. **Sou. J. Hum. Genet.** 52: 517-526, 1993.

SHI, Juan; ZHENG, Dexian. An update on gene therapy in China. **Curr. Opin. Mol. Ther.**, [s. l.], v. 11, n. 5, p. 547-553, Oct. 2009. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19806503/>. Acesso em: 04 jun. 2023.

SILVA, J.F. **Estratégia de Investigação Laboratorial de Erros Inatos do Metabolismo: Validação de Procedimento e Implantação de Controle de**

Qualidade. 2015. 10f. Relatório técnico científico (Graduação em biomedicina) – Universidade Federal do Pará, 2015.

SIFT web server: predicting effects of amino acid substitutions on proteins. Sim NL, Kumar P, Hu J, Henikoff S, Schneider G, Ng PC. *Nucleic Acids Res.* 2012 Jul;40(Web Server issue):W452-7. PMID: 22689647.

SKOOG, William A.; BECK, William S. Studies on the fibrinogen, dextran and phytohemagglutinin methods of isolating leukocytes. **Blood**, [s. l.], v. 11, n. 5, p. 436-454, May 1956. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/13315506/>. Acesso em: 04 jun. 2023.

SOFRONOVA, Viktoriia. *et al.* Hematopoietic Disorders, Renal Impairment and Growth in Mucopolysaccharidosis-Plus Syndrome. **Int. J. Mol. Sci.**, [s. l.], v. 3, n. [10], p. 1-10, May 2022. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35628659/>. Acesso em: 04 jun. 2023.

STOLZ, Alexandra; WOLF, Dieter H. Endoplasmic reticulum associated protein degradation: a chaperone assisted journey to hell. **Biochim. Biophys. Acta**, [s. l.], v. 1803, n. [6], p. 694-705, June 2010. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20219571/>. Acesso em: 04 jun. 2023.

TAPIERO-RODRIGUEZ, SM. Et al. Determinação das características genotípicas e clínicas de pacientes colombianos com mucopolissacaridose IVA. **Application of Clinical Genetics**, 2018, 11, 45–57. 10.2147/tacg.S141881.

TEBANI, A. *et al.* Clinical and Molecular Characterization of Patients with Mucopolysaccharidosis Type I in an Algerian Series. **Int J Mol Sci.** 2016 May 17;17(5):743. doi: 10.3390/ijms17050743.

The Human Gene Mutation Database at the Institute of Medical Genetics in Cardiff University. Disponível em: <https://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>. Acesso em: 04 jun. 2023.

THOMAS, G. H.; HOWELL, R. R. **Selected screening tests for genetic metabolic diseases.** Chicago: Year Book Medical Publishers, 1973. 108 p.

TOMANIN, Rosella. *et al.* Mucopolysaccharidosis type VI (MPS VI) and molecular analysis: Review and classification of published variants in the ARSB gene. **Hum. Mutat.**, [s. l.], v. 39, n. 12, p. 1788-1802, Dec. 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30118150/>. Acesso em: 04 jun. 2023.

TOMATSU, Shunji. *et al.* Neonatal cellular and gene therapies for mucopolysaccharidoses: the earlier the better?. **J. Inherit. Metab. Dis.**, [s. l.], v. 39, n. 2, p. 189-202, Mar. 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26578156/>. Acesso em: 04 jun. 2023.

TOMATSU, Shunji. *et al.* Obstructive airway in Morquio A syndrome, the past, the present and the future. **Mol. Genet. Metab.** 2016; 117:150–156. doi: 10.1016/j.ymgme.2015.09.007.

TOMATSU, Shunji. *et al.* Establishment of glycosaminoglycan assays for mucopolysaccharidoses. **Metabolites**. 2014 Aug 11;4(3):655-79. doi: 10.3390/metabo4030655.

TOMATSU, Shunji. *et al.* Newborn screening and diagnosis of mucopolysaccharidoses. **Mol. Genet. Metab.**, [s. l.], v. 110, n. 1/2, p. 42-53, Sept./Oct. 2013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23860310/>. Acesso em: 04 jun. 2023.

TOMATSU, Shunji. *et al.* Current and emerging treatments and surgical interventions for Morquio A Syndrome: A review. **Res. Rep. Endocr. Disord.** 2012;2012:65–77. doi: 10.2147/RRED.S37278.

TUSCHL, Karin. *et al.* Mucopolysaccharidosis type II in females: Case report and review of literature. **Pediatr. Neurol.**, [s. l.], v. 32, n. 4, p. 270-272, Apr. 2005. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0887899404005594>. Acesso em: 04 jun. 2023.

UNITED STATES. Food and Drug Administration. FDA approval brings first gene therapy to the United States. **U.S. Food & Drug Administration**, Washington, DC, Aug. 2017. Disponível em: <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approval-brings-first-gene-therapy-united-states>. Acesso em: 04 jun. 2023.

VALSTAR MJ. *et al.* Mucopolysaccharidosis type IIIB may predominantly present with an attenuated clinical phenotype. **J Inherit Metab Dis.** 2010 Dec;33(6):759-67. doi: 10.1007/s10545-010-9199-y. Epub 2010 Sep 18.
VALSTAR, MJ. *et al.* Mucopolissacaridose tipo IIIA: espectro clínico e genótipo - correlações fenotípicas. **Ana. Neurol.** 68: 876-887, 2010.

VASILEV, Filipp. *et al.* Mucopolysaccharidosis-Plus Syndrome. **Int. J. Mol. Sci.**, [s. l.], v. 21, n. [2], p. 1-14, Jan. 2020. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7013929/>. Acesso em: 04 jun. 2023.

VIANA, Gustavo Monteiro. **Investigação Molecular e Perfil Bioquímico de Pacientes com Mucopolissacaridoses**. 2010. 95 f. Dissertação (Mestrado em Neurociências e Biologia Celular) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará. Belém, 2010. Disponível em: http://www.dominiopublico.gov.br/pesquisa/DetalheObraForm.do?select_action=&co_obra=176155. Acesso em: 04 jun. 2023.

WANG, Dan; TAI, Phillip W. L.; GAO, Guangping. Adeno-associated virus vector as a platform for gene therapy delivery. **Nat. Rev. Drug Discov.**, [s. l.], v. 18, n. 5, p. 358–378, May 2019. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41573-019-0012-9>. Acesso em: 04 jun. 2023.

WANG, Raymond Y. *et al.* The long-term safety and efficacy of vestronidase alfa, rhGUS enzyme replacement therapy, in subjects with mucopolysaccharidosis VII. **Mol. Genet. Metab.**, [s. l.], v. 129, n. [3], p. 219-227, Mar. 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32063397/>. Acesso em: 04 jun. 2023.

WEBER B, Guo XH, Wraith JE, Cooper A, Kleijer WJ, Bunge S, Hopwood JJ. Novas mutações na síndrome de Sanfilippo A: implicações para a função enzimática. **Hum Mol Genet.** 1997; 6 (9):1573–1579. doi: 10.1093/hmg/6.9.1573.

WEBER, Birgit *et al.* Sanfilippo type B syndrome (mucopolysaccharidosis III B): allelic heterogeneity corresponds to the wide spectrum of clinical phenotypes. **European Journal of Human Genetics**, v. 7, n. 1, p. 34-44, 1999.

WRAITH J. E.; CLARKE, J. T. R. The Mucopolysaccharidoses. *In*: BLAU, Nenad (ed.). *et al. Physician's Guide to the Treatment and Follow-up of Metabolic Diseases*. Berlin: Springer; 2006. p.195 - 203.

WRAITH, J. Edmond. *et al.* Mucopolysaccharidosis type II (Hunter syndrome): a clinical review and recommendations for treatment in the era of enzyme replacement therapy. **Eur J Pediatr.** 2008 Mar;167(3):267-77. doi: 10.1007/s00431-007-0635-4. Epub 2007 Nov 23.

WRAITH, J. Edmond. *et al.* Initial report from the Hunter Outcome Survey. **Genet. Med.**, [s. l.], v. 10, n. 7, p. 508-516, July 2008. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18580692/>. Acesso em: 04 jun. 2023.

YOUNG ID, Harper OS. A História Natural da Forma Grave da Síndrome de Hunter: Um Estudo Baseado em 52 Casos. **Dev. Med. Neurol Infantil.** 1983; 25 :481–489. doi: 10.1111/j.1469-8749.1983.tb13794.x.

YOON, Ji-Hye *et al.* Oral manifestation and root canal therapy of the patient with mucopolysaccharidosis. **Restorative dentistry & endodontics**, v. 44, n. 2, 2019.

YOGALINGAM G, HOPWOOD JJ. Genética molecular da mucopolissacaridose tipo IIIA e IIIB: implicações diagnósticas, clínicas e biológicas. **Hum Mutat** 2001; 18: 264–281. doi: 10.1002/humu.1189.

ŽABIŃSKA M, *et al.* Decreased Levels of Chaperones in Mucopolysaccharidoses and Their Elevation as a Putative Auxiliary Therapeutic Approach. **Pharmaceutics**. 2023 Feb 20;15(2):704. doi: 10.3390/pharmaceutics15020704.

ZANETTI, Alessandra *et al.* Molecular diagnosis of patients affected by mucopolysaccharidosis: a multicenter study. **European Journal of Pediatrics**, v. 178, p. 739-753, 2019.

ZELEI T., Csetneki K., Voko Z., Siffel C. Epidemiologia da síndrome de Sanfilippo: Resultados de uma revisão sistemática da literatura. **Orphanet J. Rare Dis.** 2018; 13:53. doi: 10.1186/s13023-018-0796-4.

ZHAO XY, Qiao GM, Liu F. Identification and structure characterization of novel IDS variants causing mucopolysaccharidosis type II: A retrospective analysis of 30 Chinese children. **Clin Chim Acta**. 2021 Dec;523:386-394. doi:10.1016/j.cca.2021.10.020. Epub 2021 Oct 17.

ZHAO H.G., Aronovich E.L., Whitley CB. Correspondência genótipo-fenótipo na síndrome de Sanfilippo tipo B. **Am.J Hum Genet** 1998; 62:53–63.

ANEXO I: CHECKLIST - LABORATÓRIO DE ERROS INATOS DO METABOLISMO (LEIM-UFPA)

	UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA LABORATÓRIO DE ERROS INATOS DO METABOLISMO FICHA DE SOLICITAÇÃO / EXECUÇÃO DE EXAMES (não preencha os campos sombreados)	Nº _____
Nome: _____		Sexo: 2 ☐ F 1 ☐ M
Idade: _____		
Serviço requisitante: 1 ☐ SUS 2 ☐ PRIVADO		
Endereço para contato: _____ _____ _____		Cidade: _____
		Fone: _____
		Principal motivo para o exame
		1 ☐ Fácies síndrômico
		2 ☐ Convulsões
		3 ☐ ADNPM e/ou na linguagem
		4 ☐ RNPM
		5 ☐ Deficiência de crescimento
		6 ☐ Hepato e/ou esplenomegalia
		7 ☐ Icterícia
		8 ☐ Diarréia e/ou vômitos
		9 ☐ Distúrbios hidroeletrólitos
		10 ☐ Distúrbios osteoarticulares
		11 ☐ Deficiência visual
		12 ☐ Malformação congênita
		13 ☐ baixo peso
		14 ☐ distúrbio na aprendizagem
		15 ☐ distúrbio d' emarcha
		16 ☐ outro (especifique) _____
EXAMES SOLICITADOS:		MATERIAL (coleta ____/____/____)
1 ☐ Teste de triagem	☐ _____	☐ Urina
2 ☐ Cromatografia de aminoácidos	☐ _____	☐ Sangue
3 ☐ Outros _____	☐ _____	☐ _____
☐ _____	☐ _____	☐ _____
OBSERVAÇÕES:		
TESTE DE TRIAGEM NA URINA:		
1 ☐ Benedict ()	5 ☐ Nitrosonaftol ()	9 ☐ Nitroprussiato de prata()
2 ☐ Brometo de CTMA ()	6 ☐ Erlich ()	10 ☐ azul de toluidina
3 ☐ Cloreto Férrico ()	7 ☐ p-Nitroanilina ()	
4 ☐ Dinotrofenilhidrazin ()	8 ☐ Cianeto Nitroprussiato ()	Resultados : 0 ☐ negativo 1 ☐ positivo
10 ☐ Cromatografia de aminoácidos na urina:		11 ☐ Cromatografia de aminoácidos no sangue:
☐ TRIAGEM SEM ALTERAÇÕES. DADOS CLÍNICOS E LABORATORIAIS NÃO SUGEREM EIM ☐ RECOMENDADA REPETIÇÃO DE EXAMES ☐ no mesmo material ☐ em novo material ☐ RECOMEDADOS EXAMES ADICIONAIS ☐ no mesmo material ☐ em novo material		
ESPECIFICAR RECOMENDAÇÕES:		
REPETIÇÃO DE EXAMES, EXAMES ADICIONAIS, OUTRAS OBSERVAÇÕES: VIDE VERSO.		



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
LABORATÓRIO DE ERROS INATOS DO METABOLISMO

DATA: _____

IDADE: _____

NR: _____

1. Identificação

Nome: _____

DN: ____/____/____ Sexo: ☐ 2-F ☐ 1-M Nat.: _____

Mãe: _____ Natural: _____

Profissão: _____ Idade: _____ anos

Escolaridade: ☐ 0- Não sabe ; ☐ 1-Analfabeto;
☐ 2- 1ºG comp; ☐ 3- 1ºG Incompleto;
☐ 4- 2ºcomp.; ☐ 5- 2ºG incompleto;
☐ 6- superior; ☐ 7- Pós graduação

Pai: _____ Natural: _____

Profissão: _____ Idade: _____ anos

Escolaridade: ☐ 0- Não sabe ; ☐ 1-Analfabeto;
☐ 2- 1ºG comp; ☐ 3- 1ºG Incompleto;
☐ 4- 2ºcomp.; ☐ 5- 2ºG incompleto;
☐ 6- superior; ☐ 7- Pós graduação

2. Fonte de encaminhamento

1 ☐ UBS _____

2 ☐ Hospital _____

3 ☐ Instituição _____

4 ☐ Consultório _____

☐ Pediatra ☐ Clínico ☐ Enfermeira ☐ Especialista _____ ☐ Outro _____

4. História: sinais e sintomas

Quem compareceu a entrevista?

1- Mãe () 2- Pai () 3- Tio ou tia () 4- Avós () 5- Outro Familiar () 6- Outro _____

5. Antecedentes Gestacionais / – G ___ A ___ P ___

5.1- Fez pré-natal 1 Sim () 0 Não () 2 Não Sabe () N° consultas _____

5.2- 1- ☐ Gestação programada 2- ☐ Gestação não programada5.3- Ameaça de aborto : 1- Sim () ☐ Espontâneo ☐ Uso de droga abortiva _____

Período em que ocorreu: _____ Alt. Apresentadas: _____

0- Não () 2- Não Sabe ()

5.4- Desenvolvimento gestacional: 1- ☐ adequado 0- ☐ inadequado

5.5- Interc. Gest: Sangramento: 1- Sim () 0- Não 2- () Não Sabe () HAS: 1- Sim () 0- Não 2- () Não Sabe ()

Infecção: 1- Sim () 0- Não 2- () Não Sabe () Uso de drogas : 1- Sim () 0- Não 2- () Não Sabe ()

Medicamentos: 1- Sim () 0- Não 2- () Não Sabe () Diabetes: 1- Sim () 0- Não 2- () Não Sabe ()

outra 1- Sim () 0- Não 2- () Não Sabe () Qual? _____

5.6- Movimentos fetais: _____ mês 1- ☐ Ativos 2- ☐ Inicial / ativos 3- ☐ Hipoativos 4- ☐ -Hiperativos 5- ☐ Não sabe5.7- Parto: 1- ☐ Espontâneo 2- ☐ Fórceps 3- ☐ Cesáreo **Condições:** 1- ☐ chorou 0- ☐ não chorou1- ☐ termo 2- ☐ pré-termo 3- ☐ pós-termo 4- ☐ não sabe 1- ☐ corado 0- ☐ cianótico**6- Antecedentes Neonatais**

6.1- Peso ao nascer: _____ g Est ao nascer: _____ cm PC: _____ cm Apgar : 1º min: _____ Apgar: 5º min: _____

P1 _____, _____ kg; P2 _____, _____ kg, P3 _____, _____ kg A1 _____, _____ cm, A2 _____, _____ cm, A3 _____, _____ cm

6.2- Intercorrências: Cianose: 1- Sim () 0- Não () 2- Não Sabe ()

Icterícia: 1- Sim () 0- Não () 2- Não Sabe ()

Sepsis : 1- Sim () 0- Não () 2- Não Sabe ()

6.3- Distúrbio metabólico: 1- Sim () 0- Não () 2- Não Sabe (): _____

6.4- Distúrbio respiratório: 1- Sim () 0- Não () 2- Não Sabe (): _____

6.5- Problema neurológico: 1- Sim () 0- Não () 2- Não Sabe (): _____

6.6- Outro problema ou doença neonatal: 1- Sim () 0- Não () 2- Não Sabe () _____

6.7- Ficou Internado? 1- Sim () 0- Não () 2- Não Sabe () Idade: _____ tempo: _____ 0- ☐ Berçário ou 1- ☐ UTI

Dados complementares: _____

7- Evolução do paciente7.1- Infecções frequentes: 1- Sim () 1- ☐ pneumonia 2- ☐ otite 3- ☐ ITU 4- ☐ outra _____

0- Não () 2- Não Sabe ()

7.2- Outras doenças: 1- Sim () 0- Não () 2- Não Sabe (): _____

7.3- Internações: 1- Sim () nº _____ motivo: _____

0- Não () 2- Não Sabe ()

7.4- Convulsões: 1- Sim () Id. de início: _____

1 ☐ febril 2 ☐ afebril 3 ☐ Tônico 4 ☐ Clônicas 5 ☐ Tônico-clônicas 6 ☐ Mioclonicas 7 ☐ Espasmos em flexão 8 ☐ de difícil controle Descrição: _____

0- Não () 2- Não Sabe ()

7.5- Uso de medicação 1- Sim () Qual? _____

0- Não () 2- Não Sabe ()

7.6-Problema de alimentação? 1- Sim () qual?_____

0- Não () 2- Não Sabe()

7.7- Dieta especial: 1- Sim () Qual?_____

0- Não 2- () Não Sabe()

7.8- Hábito intestinal: 1- ☐ normal; 2- ☐ problema, Qual?_____

7.9- Aleitamento materno: 0- ☐ não mamou; ☐ <1 mês; 2- ☐ ≥1 a 6 meses; 3- ☐ > 6 a 1 ano;

4- ☐ > 1 ano; 5- ☐ ainda mama; 6- ☐ não sabe

7.10- Qual alimentação atual? 0- ☐ Não descrito 1- ☐ Frutas e verduras; 2- ☐ cereais; 3- ☐ leguminosas; 4- ☐ Carnes, peixes, aves; 5- ☐ leite e derivados; 6- ☐ aleitamento materno Descreva:_____

7.11- Realizou o Teste do Pezinho? 1- Sim () 0- Não () 2- Não Sabe() 3- Não lembra ()

Qual foi o Resultado? 1- ☐ Positivo; 2- ☐ negativo

Para que serve o Teste do Pezinho?_____

8. Antecedentes Familiares

8.1-Pais consangüíneos: 0- ☐ Não 1- ☐ Sim 2- ☐ Não Sabe – Grau de Parentesco _____

8.2-Casos semelhantes ao do paciente na família: 0- ☐ -Não 1- ☐ Sim 2- ☐ Não sabe – Grau de Parentesco _____

8.3- Outras doenças na família: 1- ☐ MFCI 2- ☐ MFCM 3- ☐ DM 4- ☐ DV 5- ☐ DA 6- ☐ Deficiências Múltiplas

7- ☐ Distúrbio de Desenvolvimento 8- ☐ Distúrbio de aprendizagem.

9- ☐ Outras doenças:_____

8.4-Composição racial: 1- ☐ Indígenas 2- ☐ Orientais 3- ☐ Europeus 4- ☐ Negros 5- ☐ Outra: _____

Irmandade

GESTACÃO	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
NV, NM, AE, AP										
IDADE GEST.										
SEXO: M, F, I										
Parto: C, Esp, Fo										
Peso Nascimento										
Est. Nascimento										
DATA DIA										
MÊS										
ANO										
ÓBITOS										

Causa dos óbitos _____

São todos os filhos do mesmo pai? ☐ Sim ☐ Não - Especifique na irmandade

Heredograma:

9. Desenvolvimento : 9.1-Que acha (ou achou) do desenvolvimento do paciente ao longo da vida?

9.2-Sustentou cabeça 3 a 4 m- 1- ☐ sim 0- ☐ não 2- ☐ não sabe 3- ☐ não lembra 4- ☐ ainda não está na idade

Rolou 5 a 6 m- 1- ☐ sim 0- ☐ não 2- ☐ não sabe 3- ☐ não lembra 4- ☐ ainda não está na idade

Sentou 7 a 9 meses- 1- ☐ sim 0- ☐ não 2- ☐ não sabe 3- ☐ não lembra 4- ☐ ainda não está na idade

Arrastou 7 a 9 meses- 1- ☐ sim 0- ☐ não 2- ☐ não sabe 3- ☐ não lembra 4- ☐ ainda não está na idade

Engatinhou 10 a 12 meses- 1- ☐ sim 0- ☐ não 2- ☐ não sabe 3- ☐ não lembra 4- ☐ ainda não está na idade

ficou de pé 10 a 12 meses- 1- ☐ sim 0- ☐ não 2- ☐ não sabe 3- ☐ não lembra 4- ☐ ainda não está na idade

Andou 13 a 18 meses- 1- ☐ sim 0- ☐ não 2- ☐ não sabe 3- ☐ não lembra 4- ☐ ainda não está na idade

Linguagem 13 a 18 meses- 1- ☐ sim 0- ☐ não 2- ☐ não sabe 3- ☐ não lembra 4- ☐ ainda não está na idade

9.3- Boa interação 1- Sim () 0- Não () 2- Não sabe () Não interage 1- Sim () 0- Não () 2- Não sabe ()

visão preservada 1- Sim () 0- Não () 2- Não sabe () audição preservada 1- Sim () 0- Não () 2- Não sabe ()

9.4-AVDS: ☐ independente ☐ dependente ☐ semi-dependente

9.5-Distúrbio do sono 1- Sim () 0- Não () 2- Não sabe () Qual? _____

9.6-Escolaridade: 1- ☐ Normal 2- ☐ Especial _____

9.7-Comportamento: 1- ☐ Normal 2- ☐ Irritado 3- ☐ Agressivo 4- ☐ Autista 5- ☐ Autista like

6- ☐ Hiperativo 7- ☐ Outro _____

10. Condições Ambientais / Econômicas / Atenção

10.1-Moradia: 1- ☐ Alvenaria 2- ☐ Madeira 3- ☐ Outro _____

Piso: 1- ☐ lajota; 2- ☐ cimento; 3- ☐ madeira; 4- ☐ outro _____ N° de compartimentos: _____

10.2- 1- ☐ água rede pública 2- ☐ água de poço 3- ☐ Outra fonte _____

10.3- 1- ☐ Pai do paciente c/ trabalho remunerado; 2- ☐ Mãe do paciente c/ trabalho remunerado; 3- ☐ Outro familiar do paciente c/ trabalho remunerado; 4- ☐ Paciente com trabalho remunerado; 5- ☐ ninguém trabalha

O paciente tem benefício? 1- Sim () 0- Não () Qual? _____

11. Renda familiar:

11.1-N° de salários mínimos/mês: _____ N° de pessoas dependentes: _____ Renda per capita _____

11.2-Acesso a serviço de saúde: 1- ☐ Plano de saúde 2- ☐ SUS 3- ☐ Outro: _____

11.3-O paciente tem cartão da criança? 1- Sim () 0- Não () 2- Não sabe ()

11.4- Vacinas estão atualizadas 1- Sim () 0- Não () 2- () Não sabe () ;

Foi acompanhado desenvolvimento? 1- Sim () 0- Não () 2- Não sabe () ;

Foi acompanhado crescimento? 1- Sim () 0- Não () 2- Não sabe ()

11.5-Quem cuida da criança? De dia: 1- ☐ mãe; 2- ☐ pai; 3- ☐ outros _____

E a noite? 1- ☐ mãe; 2- ☐ pai; 3- ☐ outros _____

11.6-Que idade tinha o paciente quando percebeu seu problema? _____

11.7-Quem observou que o paciente tinha problema? 1- ☐ mãe; 2- ☐ pai; 3- ☐ avós; 4- ☐ parentes; 5- ☐ médicos; 6- ☐ outros; 7- ☐ não sabe

11.8-Realiza algum tratamento especial? 1- ☐ SIM 0- ☐ NÃO 2- ☐ Não sabe

Qual o tratamento? 1- ☐ Fisioterapia 2- ☐ Terapia ocupacional 3- ☐ Fonoaudiologia 4- ☐ Psicologia 5- ☐

Acompanhamento com neurologista 6- ☐ nutricionista 7- ☐ Outro: _____ 8- ☐ nenhum

ANEXO II :TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
LABORATÓRIO DE GENÉTICA HUMANA E MÉDICA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TÍTULO DO PROJETO: Avaliação epidemiológica, genética, molecular e bioquímica de pacientes com mucopolissacaridoses (MPS) na Região Norte do Brasil.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Luiz Carlos Santana da Silva, Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo. Rua Augusto Côrrea, 01 - Cidade Universitária Prof. José da Silveira Netto, Laboratório de Genética Humana e Médica, Guamá, CEP 66075970, Belém, PA.

Nome do paciente: _____

Endereço: _____

Cidade: _____ Estado _____ CEP _____ Fone: (____) _____

Email: _____

Responsável: _____ Idade: _____

RG: _____ Grau de parentesco: _____

Justificativa e objetos do estudo

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

Procedimentos a que serão submetidos os pacientes

Os pacientes com suspeita de apresentar uma mucopolissacaridose serão submetidos a uma avaliação clínica. Caso a suspeita persista, serão coletadas amostras de urina para análise bioquímica e amostras de sangue para análises bioquímicas e/ou molecular. A investigação molecular inclui a análise de DNA, através de procedimentos técnicos de biologia molecular visando a identificação de mutações presentes nas mucopolissacaridoses. Eventualmente, poderão ser solicitadas amostras de familiares de pacientes para o esclarecimento do caso, identificação de familiares portadores de mutações, aconselhamento genético e diagnóstico pré-natal. Os resultados das análises serão encaminhados ao médico do paciente, ficando sob responsabilidade deste a informação do resultado ao paciente e/ou familiar.

Armazenamento de dados e amostras

Os dados clínicos e laboratoriais serão registrados em um banco de dados e as amostras ficarão armazenadas em um banco de material biológico. Essas amostras poderão ser utilizadas em estudos sobre mucopolissacaridoses que estejam vinculados a este projeto.

Benefícios esperados

Com o diagnóstico do tipo de Mucopolissacaridose, o paciente poderá se beneficiar das medidas de tratamento eventualmente disponíveis, além de possibilitar aconselhamento genético.

Caso tenha alguma dúvida ou queira algum esclarecimento adicional, contatar:

Concordo em participar do projeto de pesquisa “Avaliação epidemiológica, genética, molecular e bioquímica de pacientes com mucopolissacaridoses (MPS) na Região Norte do Brasil” e autorizo a utilização das minhas amostras biológicas em estudos relacionados com este projeto.

Data: ____/____/____

Paciente ou responsável: _____

Responsável pelo estudo: _____

ANEXO III: PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

UFPA - INSTITUTO DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO
PARÁ



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Estudo da Mucopolissacaridose no Brasil

Pesquisador: MISLENE CISZ

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 25734319.2.1001.0018

Instituição Proponente: Instituto de Ciências Biológicas

Patrocinador Principal: Universidade Federal do Pará

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.003.806

Apresentação do Projeto:

As Mucopolissacaridoses (MPS) correspondem a um grupo de doenças lisossômicas de depósito (DLD), consistem em um raro grupo de doenças metabólicas hereditárias e são causadas pela deficiência de enzimas lisossomais específicas responsáveis pela degradação de glicosaminoglicanos (GAG). Uma vez não degradados, os GAG acumulam-se em vários tecidos e órgãos, levando ao desenvolvimento de uma doença crônica de caráter progressivo e multisistêmico. Este trabalho propõe analisar o perfil epidemiológico, genético, bioquímico e molecular de pacientes com Mucopolissacaridoses no Estado do Pará.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário: •Analisar o perfil epidemiológico, genético, bioquímico e molecular de pacientes com Mucopolissacaridoses no Estado do Pará.

Objetivo Secundário: •Análise molecular do gene IDUA em pacientes com MPS I;•Análise molecular do gene IDS em pacientes com MPS II;•Análise molecular do gene NAGLU em paciente com MPS IIIB;•Análise molecular do gene ARSB em pacientes com MPS VI.•Avaliar o padrão de excreção de GAG dos pacientes com MPS I e VI antes e durante a TRE;•Avaliar a eficácia da TRE em pacientes com MPS I e VI através do monitoramento bioquímico da dosagem urinária de glicosaminoglicanos;•Verificar possíveis correlações entre o perfil bioquímico (excreção de GAG) e o genótipo apresentado pelos pacientes com MPS I e VI;•Investigar o perfil epidemiológico da

Endereço: Rua Augusto Corrêa nº 01- Campus do Guamá ,UFPA- Faculdade de Enfermagem do ICS - sala 13 - 2º and.
Bairro: Guamá **CEP:** 66.075-110
UF: PA **Município:** BELEM
Telefone: (91)3201-7735 **Fax:** (91)3201-8028 **E-mail:** cepccs@ufpa.br

**UFPA - INSTITUTO DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO
PARÁ**



Continuação do Parecer: 4.003.806

mucopolissacarídeos Na Região Norte do Brasil.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: Os exames realizados não trazem riscos aos pacientes, além dos incômodos eventuais de uma coleta de sangue e urina.

Benefícios: Os pacientes terão seu diagnóstico confirmado por sequenciamento. Os dados referentes à TRE ajudaram no controle e evolução dos pacientes e serviram de referência para os demais casos similares. Através do estudo epidemiológico teremos o perfil dos pacientes com suspeita de MPS na Região Norte do Brasil.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O protocolo encaminhado dispõe de metodologia e critérios definidos conforme resolução 466/12 do CNS/MS. Trata ainda em resolver pendências citadas no parecer nº 3.898.060, que depois de analisadas este colegiado entende como satisfatória e aceita.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos apresentados, nesta versão, contemplam os sugeridos pelo sistema CEP/CONEP.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Diante do exposto somos pela aprovação do protocolo. Este é nosso parecer, SMJ.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_995814.pdf	17/04/2020 23:35:42		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TERMOS.pdf	03/03/2020 10:34:12	MISLENE CISZ	Aceito
Outros	termo_de_consentimento_institucional.pdf	16/11/2019 00:12:46	MISLENE CISZ	Aceito
Outros	termo_de_compromisso.pdf	16/11/2019 00:06:29	MISLENE CISZ	Aceito
Outros	declaracao_isencao_de_onus.pdf	15/11/2019 23:51:46	MISLENE CISZ	Aceito

Endereço: Rua Augusto Corrêa nº 01- Campus do Guamá, UFPA- Faculdade de Enfermagem do ICS - sala 13 - 2º and.
Bairro: Guamá **CEP:** 66.075-110
UF: PA **Município:** BELEM
Telefone: (91)3201-7735 **Fax:** (91)3201-8028 **E-mail:** cepocs@ufpa.br

**UFPA - INSTITUTO DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO
PARÁ**



Continuação do Parecer: 4.003.808

Outros	carta_encaminhamento.pdf	15/11/2019 23:23:54	MISLENE CISZ	Aceito
Outros	termo_aceite_orientador.pdf	15/11/2019 23:21:10	MISLENE CISZ	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.pdf	25/05/2019 23:06:40	MISLENE CISZ	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	HUBFS.docx	23/05/2019 00:53:08	MISLENE CISZ	Aceito
Folha de Rosto	folha.pdf	23/05/2019 00:49:40	MISLENE CISZ	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BELEM, 02 de Maio de 2020

Assinado por:

**Wallace Raimundo Araujo dos Santos
(Coordenador(a))**

Endereço: Rua Augusto Corrêa nº 01- Campus do Guamá ,UFPA- Faculdade de Enfermagem do ICS - sala 13 - 2º and.
Bairro: Guamá **CEP:** 66.075-110
UF: PA **Município:** BELEM
Telefone: (91)3201-7735 **Fax:** (91)3201-8028 **E-mail:** cepccs@ufpa.br

ANEXO IV: PROTOCOLO DE DOSAGEM DE GAG NA URINA

I) REAGENTES:

1. Condroitin sulfato A (se usa o A – o B é o dermatan)
2. Tampão formato de sódio
3. Corante DMB
4. Tris

II) PREPARO:

1. Condroitin sulfato- SOLUÇÃO MÃE:

- a) Pesar 20 mg de condroitim sulfato e diluir em 10 ml de água destilada (balão volumétrico)
- b) Diluir 1/10 solução mãe: 1mL + 9 mL de água dest (balão volumétrico) – aliquotar (solução de uso)
- c) Guardar no freezer armazenado em eppendorfs.

2. Tampão formato de sódio pH 3,3 55mM:

- a) Pesar 3,74g de formato de sódio e diluir em 1000ml de água destilada.
- b) Acertar o pH para 3,3 com ácido fórmico.
- c) Guardar na geladeira.

3. Corante DMB:

- a) Pesar 10,7 mg do corante DMB e diluir em 100 ml de Tampão formato de sódio.
- b) Congelar como solução estoque 10 vezes concentrada.
- c) Diluir na proporção 1:10 com o Tampão formato de sódio na hora do uso.

4. Tris hidroximetil aminometano:

- a) Pesar o Tris de acordo com a quantidade de corante a ser usada e diluir com água destilada na hora do uso, utilizando agitação sem aquecimento.

1ml Tris – 10 ml DMB

2,422g Tris – 10ml água destilada

III) PROCEDIMENTO:

1. Fazer uma curva padrão com 6 pontos de diluição e 1 tubo branco. No branco, colocar apenas água. Nos demais, colocar condroitim sulfato diluído conforme o esquema:

	CS (µl)	Água (µl)	Concentr.
branco	0	500	-
2	10	490	2
3	20	480	4
4	40	460	8
5	60	440	12
6	80	420	16
7	100	400	20

2. Centrifugar cada amostra de urina por 10 minutos a 2000/3000 rpm para precipitar o sedimento. (**PS:** Amostras de líquido amniótico não devem ser centrifugadas).

3. Diluir 250 µl de urina centrifugada em 250 µl de água destilada.
4. Agitar em vórtex os tubos das amostras e os tubos da curva para homogeneizar.
5. Adicionar a cada tubo 2,5 ml da solução do corante DMB diluído 10 vezes em Tampão formato de sódio junto com o Tris diluído em água na hora da leitura. Adicionar e ler no mesmo momento em espectrofotômetro com absorvância de 530 nm, ou seja, a adição do DMB é feita um a um no momento da leitura.

IV) CÁLCULOS:

1. Descontar o branco de cada amostra, inclusive as da curva.
2. Fazer o cálculo do Qm de cada tubo da curva, dividindo a concentração pela (absorvância – branco).
3. Calcular o Qm médio da curva.
4. Cálculo da amostra:

$$(absorvância - branco) \times Qm \times 4000 / creatinina = resultado em ug/mg creat$$

$$\text{Resultado em mg/g} / 8,84 = \text{resultado em mg/mmol CREA}$$

5. O resultado é expresso em ug/mg creat
6. Resultado em mg/L (controle de qualidade):

$$(absorvância - branco) \times Qm \times 4$$

V) DILUIÇÃO

Para leituras acima de 0,300 de Abs, o método não detecta. Para estas amostras, fazer uma diluição:

- a) Diluição 1/5: Diluir 100µl de urina em 400µl de água destilada; pipetar 250µl dessa amostra e 250µl de água destilada. Multiplicar o cálculo por 5.
- b) Diluição 1/10: Diluir 100µl de urina em 900µl de água e pipetar, então, 250µl dessa amostra com 250µl de água destilada. Multiplicar o cálculo por 10.

VI) INTERPRETAÇÃO

Comparar o resultado obtido com a tabela de valores padronizados da excreção de GAGS na urina, de acordo com a idade do paciente. Resultados que se apresentam mais altos do que o padrão pode indicar um acúmulo de GAG, podendo diagnosticar uma mucopolissacaridose.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA:

De Jong J. G. N., Wevers R. A. Liebrand-van Sambeek R. Measuring urinary glycosaminoglycans in the presence of protein: an improved screening procedure for Mucopolysaccharidoses based on dimethylmethylene blue. Clin. Chem.,1992, 38/6, 803-7.

ANEXO V: PROTOCOLO PARA ELETROFORESE DE GLICOSAMINOGLICANOS NA URINA ELETROFORESE DE GLICOSAMINOGLICANOS

Adaptado do protocolo descrito por Alfredo Uribe

Princípio

A separação de glicosaminoglicanos (GAG) por este método, baseia-se na separação de cada um dos componentes dos GAG urinários (condroitin sulfato, queratan sulfato, heparan sulfato e dermatan sulfato) em um campo elétrico descontinuo sobre um gel de agarose, usando também as propriedades de solubilidade diferencial em concentrações de etanol.

Amostra

Glicosaminoglicanos extraídos e purificados a partir da amostra de urina (reportar-se a técnica da cromatografia de glicosaminoglicanos).

Material

1. Placa de vidro 12x15cm
2. Nivelador e pente de impressão
3. Agarose 1% em acetato de bário 0,15M pH 5,0
4. Acetato de bário 0,3 pH 5,0 acidificado com ácido acético glacial
5. Acetato de bário 0,15M pH 5,0 acidificado com ácido acético glacial
6. Etanol p.a. 50% em acetato de bário 0,15M pH 5,0
7. Etanol p. a. 35% em acetato de bário 0,15M pH 5,0
8. Azul de toluidina 1% em etanol : água : ácido acético (66,5:28,5:05)
9. Padrões: Condroitin sulfato, dermatan sulfato, queratan sulfato e heparan sulfato: 2mg/ml água dest.
10. Papel Whatmann
11. Microseringa para aplicação das amostras

Preparo dos reagentes

1. **Gel de agarose 1%** (no momento do procedimento)
 - Pesar 800mg de agarose + 80ml de acetato de bário 0,15M pH 5,0
 - Levar ao microondas até a completa dissolução da agarose
 - Nivelar a placa de vidro com nivelador
 - Derramar o gel de agarose no centro da placa até preenchê-la completamente.
 - Colocar o pente para a formação dos poços e aguardar a solidificação (± 10 min.)
 - Após retirar o pente com cuidado
2. **Acetato de bário 0,3M (P.M. 255,43g)**
 - Pesar 76,63g de acetato de bário e diluir em 1 litro de água dest.
 - Ajustar pH 5,0 com ácido acético glacial
3. **Acetato de bário 0,15M**
 - Pesar 38,31g de acetato de bário e diluir em 1 litro de água dest.
 - Ajustar pH 5,0 com ácido acético glacial
4. **Etanol 50%**

- 250ml de etanol p.a. + 250ml de acetato de bário 0,15M

5. Etanol 35%

- 175ml de etanol p.a. + 325ml de acetato de bário 0,15M

6. Azul de toluidina 1%

- Pesar 2,5g de azul de toluidina e adicionar 166ml de etanol p.a. + 72ml de água dest. + 12ml de ácido acético.

PROCEDIMENTO

Preparo da placa

1. Organizar as amostras a serem aplicadas
2. Aplicar 5µl de amostra em cada poço
3. Aplicar, no 1º poço das extremidades, o padrão de condroitin sulfato e no poço central o padrão de queratan sulfato
4. Colocar a placa na cuba de eletroforese centralizando-a

Migração (“corrida”)

1. Colocar tampão acetato de bário 0,3M pH 5,0 nos compartimentos da cuba de eletroforese
2. Colocar a placa, com as amostras e padrões já aplicados, na cuba centralizando-a
3. Encostar tiras de papel Whatmann nas extremidades da placa para que o tampão entre em contato com o gel (umedecer bem o papel com o tampão evitando derramar sobre o gel)
4. Programar a fonte na voltagem de 70 a 100volts/60-70 mA
5. 1ª corrida em torno de 1 hora e após retirar a placa da cuba de eletroforese e mergulhá-la na solução de etanol 50% por 15 min.
6. Após lavar a placa com água da torneira, secar a parte posterior e recolocá-la na cuba de eletroforese e recolocar tb as pontes de papel Whatmann
7. 2ª corrida em torna de 1h e 30min.. Após retirar a placa novamente da cuba e mergulhá-la na solução mde etanol 35% por 15min.
8. Idem ao item 6
9. 3ª corrida ± 3 horas
10. Colorir aplaca com azul de toluidina 1% por 15min.
11. Descorar com água da torneira até uma boa visualização das bandas (overnight).

ANEXO VI:

Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo**Protocolo Operacional Padrão (POP)**

N° do POP: 03

Data de elaboração: 05/08/2016**Técnica: Extração de DNA de sangue total – Kit Purelink Invitrogen****Responsável: Maria Helena Mala/ João Marcos****I. Equipamentos necessários:**

- Luvas de látex, gorro e máscara
- Racks para tubo *falcon* e *ependorf*;
- Eppendorfs de 2 ml autoclavados;
- Pipeta de 100 – 1000 µl;
- Ponteiras autoclavadas de 200 µl e 1000 µl;
- Pipeta de 100 µl
- Pipeta de 1000 µl
- Descarte de sangue;
- Descarte de ponteiras.
- Piceta com álcool 70%
- Piceta com hipoclorito a 2,5%
- Papel toalha
- Microcentrifuga
- Banho maria

II. Método :**1º Etapa: Lise de Hemácias**

1. Ajuste o banho-maria ou bloco térmico para 56°C.
2. Em um tubo de microcentrifuga estéril, adicione quantidade menor ou igual a 200 µl da amostra de sangue fresco ou congelado (se usar menos de 200 µl, complete o volume do tubo para 200 µl usando PBS).
3. Adicione **20 µl de Proteinase K** (fornecida com o kit) à amostra.
4. Adicione **20 µl de RNase A** (fornecida com o kit) à amostra, misturar bem com auxílio do vórtex e incubar em temperatura ambiente por 2 minutos.
5. Adicionar **200 µl do Purelink® Genomic Lysis/Binding Buffer** e misturar bem com auxílio do vórtex para se obter uma solução homogênea.
6. Incubar em 56°C por 10 minutos para promover a degradação das proteínas.
7. Adicionar 200 µl de álcool 96 – 100% ao lisado. Misturar bem com o auxílio do vórtex por 5 segundos para se obter uma solução homogênea.
8. Proceder imediatamente para a próxima etapa: Ligação do DNA.

2º Etapa : Ligação do DNA – Kit Purelink®

1. Remover Purelink® Spin Column em um tubo coletor do pacote.
2. Adicionar o lisado (aproximadamente 640 µl) preparado com o Purelink® Genomic Lysis/Binding Buffer e etanol à Purelink® Spin Column.
3. Centrifugar a coluna em 10.000 rpm por um minuto em temperatura ambiente.

Nota: Se você está processando mais de 200 µl de um material inicial como sangue, swabs bucais ou Oragene™ preserved saliva, você precisa realizar o carregamento múltiplo do lisado por transferência de qualquer lisado restante para a mesma Purelink® Spin Column (acima) e centrifugar a 10.000 rpm por 1 minuto.

4. Descartar o tubo coletor e colocar a coluna dentro de um novo tubo coletor fornecido com o kit.
5. Proceder para a próxima etapa: Lavagem do DNA.

3º Etapa: Lavagem do DNA – Kit Purelink®

1. Adicionar 500 µl do Wash Buffer 1 preparado com etanol à coluna.
2. Centrifugar a coluna em temperatura ambiente a 10.000x por 1 minuto.
3. Descartar o tubo coletor e colocar a coluna em um novo tubo coletor fornecido com o kit.
4. Adicionar 500 µl do Wash Buffer 2 preparado com etanol à coluna.
5. Centrifugar a coluna em velocidade máxima por 3 minutos em temperatura ambiente.
Descartar tubo coletor. (14.000)
6. Proceder para a próxima etapa: Eluição do DNA.

4º Etapa: Eluição do DNA – Kit Purelink®

1. Colocar a coluna em um tubo de microcentrifuga estéril de 1,5mL.
2. Adicionar 25 – 200 µl do Purelink® Genomic Elution Buffer à coluna. Veja os parâmetros de eluição para escolher a o volume adequado de eluição para o que você precisa.
3. Incubar em temperatura ambiente por 1 minuto. Centrifugar a coluna por temperatura-
velocidade (14.000 rpm) máxima por 1 minuto em temperatura ambiente. O tubo contém DNA genômico purificado.

Armazenamento do DNA

- * Armazenar o DNA purificado em -20°C ou use o DNA para a finalidade desejada.
- * Para armazenamento de longo prazo, armazene o DNA em Purelink® Genomic Elution Buffer em -20°C, já que o DNA armazenado em água é submetido a hidrólise ácida.
- * Para evitar ciclos repetidos de congelamento e descongelamento de DNA, armazene o DNA em 4°C para uso imediato ou faça alíquotas do DNA, e armazene o restante a temperatura de -20°C para longo prazo de armazenamento.