

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: BIOQUÍMICA
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

**DETECÇÃO DE HETEROZIGOTOS PARA MUCOPOLISSACARIDOSE DO TIPO I
HURLER, SCHEIE E HURLER/SCHEIE ATRAVÉS DAS CARACTERÍSTICAS
BIOQUÍMICAS DA ENZIMA α -L-IDURONIDASE**

JOVANA MANDELLI

Porto Alegre
2001

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: BIOQUÍMICA
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

**DETECÇÃO DE HETEROZIGOTOS PARA MUCOPOLISSACARIDOSE DO TIPO I
HURLER, SCHEIE E HURLER/SCHEIE ATRAVÉS DAS CARACTERÍSTICAS
BIOQUÍMICAS DA ENZIMA α -L-IDURONIDASE**

Jovana Mandelli

Orientadora: Profa. Janice Carneiro Coelho

Tese apresentada ao Curso de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul para a obtenção de título de Doutora em Bioquímica.



DEDICATÓRIA
À Janice, exemplo no qual sempre me espelharei.

AGRADECIMENTOS

- À Prof.a Janice Carneiro Coelho, orientadora deste trabalho, pela confiança, pelos ensinamentos, pelo estímulo à investigação e sua participação ativa na realização deste projeto e, principalmente, pela sua amizade;
- Ao bolsista e amigo Alessandro Wajner, por todo apoio na realização direta deste projeto;
- Ao Dr. Ricardo Pires, pela participação ativa no contato e entrevistas com os pais;
- Ao Prof. Dr. Moacir Wajner, pela revisão e auxílio no segundo artigo;
- Aos Médicos e às colegas Úrsula Matte e Ida Schwartz que colaboraram com este projeto, empenhando-se na obtenção de amostras e, também, a todos os colegas do Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas e do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul;
- Aos órgãos de fomento CNPq, PROPESQ/UFRGS e GPPG/HCPA;
- Aos pais que entenderam a importância da realização deste projeto e cuja participação foi fundamental para a realização deste;
- **À minha família, principalmente aos meus pais, principal fonte de aprendizado, crescimento, apoio, força e por fazer acreditar que sempre é possível alcançar nossos objetivos.**

SUMÁRIO

RESUMO.....	v
INTRODUÇÃO.....	7
1 Mucopolissacaridoses.....	7
2 Classificação das Mucopolissacaridoses.....	10
3 Mucopolissacaridose Tipo I.....	13
3.1 Subtipos da MPS I.....	13
a Síndrome de Hurler ou MPS IH.....	13
b Síndrome de Scheie ou MPS IS.....	14
c Síndrome de Hurler/Scheie ou MPS IH/S.....	15
3.2 Dados Epidemiológicos.....	16
3.3 Aspectos Moleculares.....	17
3.4 Aspectos Bioquímicos.....	18
3.5 Diagnóstico.....	24
3.6 Tratamento.....	25
3.7 Identificação de Heterozigotos.....	27
OBJETIVOS.....	30
CAPÍTULO I: Detection of Mucopolysaccharidosis Type I Heterozygotes Based on the Biochemical Characteristics of Leucocyte α -L- iduronidase.....	32
Abstract.....	34
Key words.....	35
Introduction.....	36
Materials and Methods.....	38
Results.....	40
Discussion.....	43

Acknowledgements.....	46
References.....	47
Figure Legends.....	49
Table 1.....	50
Figure 1.....	51
Figure 2.....	52
Figure 3.....	53
Capítulo II: Detection of Mucopolysaccharidosis type I heterozygotes on the basis of the biochemical properties of plasma α -L-iduronidase.....	54
Abstract.....	56
Introduction.....	57
Materials and Methods.....	59
Results.....	61
Discussion.....	64
Acknowledgements.....	68
List of Abbreviations	69
References.....	70
Figure Legends.....	72
Figure 1.....	73
Figure 2.....	74
Figure 3.....	75
Capítulo III: Effect of CuCl_2 , NaCl and EDTA on the enzyme α -l-iduronidase in the plasma of heterozygotes for MPS I and normal individuals.....	76
Abstract.....	78
Introduction.....	79
Materials and Methods.....	82
Results.....	84
Discussion.....	88
Acknowledgements.....	92
List of Abbreviations.....	93
References.....	94
Figure Legends.....	96
Table 1.....	97
Figure 1.....	98
DISCUSSÃO.....	99
CONCLUSÕES.....	106
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	109

RESUMO

A Mucopolissacaridose tipo I (MPS I) é uma doença causada pela deficiência da enzima α -L-iduronidase (IDUA). Como, para este distúrbio, ainda não há tratamento eficaz, a detecção de heterozigotos torna-se muito importante para o aconselhamento genético e o diagnóstico pré-natal. O objetivo deste trabalho foi caracterizar a IDUA de plasma e leucócitos de heterozigotos para MPS I, tentando diferenciá-la daquela de indivíduos normais. Para isto, determinou-se a atividade enzimática, pH ótimo, Km, velocidade máxima (Vmax) e termoestabilidade da enzima a 50°C em amostras de plasma e leucócitos. Além destes parâmetros, utilizou-se também, em plasma, a cotangente do ângulo ($C\alpha$) e verificou-se a resposta da IDUA de plasma perante compostos como cloreto de sódio, cloreto de cobre e EDTA adicionados ao meio de incubação. Os heterozigotos para MPS I foram separados em dois grupos de acordo com a atividade da IDUA de leucócitos. Um grupo (grupo 1) possuía atividade enzimática inferior àquela dos controles e outro (grupo 2), atividade enzimática

semelhante. Em leucócitos, a IDUA de heterozigotos apresentou três pH ótimos e aquela de indivíduos normais, somente um. O Km da enzima de indivíduos normais foi semelhante àquele do grupo 1 de heterozigotos e maior que o do grupo 2. Com base nos parâmetros bioquímicos da IDUA de leucócitos, os indivíduos normais foram distinguidos, de todos os heterozigotos para MPS I avaliados, em relação à Vmax e à termoestabilidade da IDUA a 50°C. Em plasma, a IDUA de indivíduos normais, possui atividade semelhante àquele de heterozigotos para MPS I e atua em uma mesma faixa de pH ótimo. Ocorreu diferença significativa entre o Km da IDUA de plasma dos controles e aquele da enzima de heterozigotos. Esta enzima apresentou a mesma Vmax nos dois grupos de indivíduos e uma $C\alpha$ significativamente diferente, o que permitiu a separação entre eles. Assim como em leucócitos, a estabilidade da enzima a 50°C também foi diferente nos dois grupos analisados, permitindo a separação dos mesmos. Também detectou-se diferenças significativas capazes de diferenciar indivíduos heterozigotos para MPS I de indivíduos normais pela simples adição de cloreto de sódio, EDTA ou cloreto de cobre ao meio de incubação. Estes três compostos mostraram ser inibidores da IDUA de plasma. Levando-se em consideração todos os parâmetros analisados, pode-se concluir que a enzima de heterozigotos para MPS I comporta-se de maneira diferente daquela de indivíduos normais, sendo a incubação da IDUA a 50°C por 15 minutos (leucócitos) ou 12 ou 24 horas (plasma), antes da adição do substrato da reação, um simples e eficiente teste para a detecção de heterozigotos para a MPS I. Este método pode ser utilizado para a triagem de famílias de alto risco, mesmo em laboratórios não especializados.

INTRODUÇÃO

1 Mucopolissacaridoses

As mucopolissacaridoses (MPS) são erros inatos do metabolismo (EIM) que envolvem doenças hereditárias raras ligadas à degradação de mucopolissacarídeos ou glicosaminoglicanos (GAGs) por enzimas lisossômicas (Anderson e Kissane, 1982; Neufeld e Muenzer, 2001). Como consequência, ocorre o acúmulo dos resíduos não degradados nos lisossomos que, por sua vez, perdem a função fisiológica, comprometendo toda a estrutura celular. Isto acarreta sérios distúrbios em diferentes órgãos, que caracterizarão diferentes tipos de MPS (Neufeld e Muenzer, 2001).

Os mucopolissacarídios são moléculas formadas por longas cadeias de polissacarídios não ramificadas, compostos de hexosaminas e ácido hexurônico. São, ainda, negativamente carregados, ocupam grandes volumes, são altamente hidrofílicos, formam gel hidratado mesmo em baixas concentrações e são também

constituintes importantes da matriz extracelular. As células do tecido conjuntivo sintetizam os mucopolissacarídeos e estão, também, envolvidas em sua degradação.

Os mucopolissacarídeos passaram a ser denominados glicosaminoglicanos (GAGs) após a década de 60, pois um dos resíduos de açúcar na unidade dissacarídica repetitiva é sempre um aminoaçúcar. A maioria destas repetições dissacarídicas é composta por D-glucosamina ou D-galactosamina e ácido D-glucorônico ou L-idurônico e grupos éster sulfato. Dependendo do resíduo de açúcar, do tipo de ligação entre eles e do número e localização dos grupos sulfatados, são definidos cinco grupos de GAGs. Estes são o hialuronan, antigamente chamado de ácido hialurônico (Neufeldt e Muenzer, 2001), o condroitin sulfato, o queratan sulfato, o dermatan sulfato e o heparan sulfato (Winchester, 1996). O hialuronan não contém éster sulfato e o queratan sulfato contém galactose em vez de ácido urônico (ou hexurônico). O heparan sulfato possui também sulfato ligado ao grupo amino da glicosamina (Anderson e Kissane, 1982). Um resumo das principais características e a localização dos GAGs encontra-se na tabela 1.

Com exceção do hialuronan, os GAGs são ligados de modo covalente pela sua extremidade redutora a uma matriz protéica específica, formando glicoproteínas macromoleculares ou proteoglicanos. Estes proteoglicanos são amplamente distribuídos em todas as matrizes extracelulares e são também encontrados nas superfícies celulares e na maioria dos líquidos biológicos (Gilbert-Barness e Barness, 2000; Neufeld e Muenzer, 2001). Nos tecidos, encontram-se freqüentemente ligados às fibras colágenas, fibras elásticas e

fibronectina. Esta estrutura dá elasticidade aos tecidos e os capacita a manter a sua conformação característica. Também estão ligados ao controle da coagulação sangüínea e à regulação do crescimento e adesão celular (Stringer e Gallacher, 1997; Rosemberg et al., 1997).

1: Principais Componentes Estruturais e Localização dos GAGs Goldenfun (1990), adaptado.

GAG	PM (daltons)	Ácido urônico	Hexosamina	Sulfato	Localização
Hialuronan	10^5-10^7	Glicurônico	D-glicosamina	-	colágeno e elastina
Condroitin sulfato	$3-5 \times 10^5$	Glicurônico	D-galactosamina	O-sulfato	cartilagem
Heparan sulfato	2×10^4	Ac. Glicurônico Ac. Idurônico	D-glicosamina	N-sulfato O-sulfato	membranas celulares
Dermatan sulfato	$2-3 \times 10^4$	Ac. Idurônico Ac. Glicurônico	D-galactosamina	O-sulfato	tecido conjuntivo intersticial
Queratan sulfato	$1-2 \times 10^4$	D-Galactose	D-glicosamina	O-sulfato	cartilagem, córnea e núcleo pulposos

A degradação dos proteoglicanos inicia pela sua clivagem por proteases extracelulares. Cadeias hidrofílicas de até 12 GAGs são liberadas e endocitadas por condrócitos ou células endoteliais. A degradação intracelular subsequente é feita pela ação seqüencial das enzimas lisossomais (Winchester, 1996). A degradação lisossomal produz monossacarídeos e sulfato inorgânico (Hopwood e Morris, 1990).

2 Classificação das Mucopolissacaridoses

Os distúrbios decorrentes do acúmulo de GAGs nos lisossomos são muito semelhantes em todos os tipos de mucopolissacaridoses. Algumas características clínicas comuns são a presença de um nanismo moderado, de um tórax proeminente, ossos largos, curtos e engrossados e, notadamente, um abdome protuberante com hepatoesplenomegalia, freqüentemente acompanhadas por hérnia. Além desses, são também notados face grosseira e semelhante a gárgulo, pele seca, doença cardíaca e, em inúmeros casos, retardo mental (Gilbert-Barness e Barness, 2000; Neufeld e Muenzer, 2001). Algumas das manifestações (face grosseira, espessamento cutâneo e visceromegalia) são causadas diretamente pelo acúmulo de GAGs nos tecidos, enquanto que outras, como deficiência mental e o retardo de crescimento, são resultantes da alteração da função celular. Também os GAGs podem interferir diretamente na estrutura de substâncias como o colágeno, levando a sintomas de contratura articular (Neufeld e Muenzer, 2001).

Existem 7 tipos de MPS (I, II, III, IV, VI, VII e, mais recentemente, a IX), sendo cada uma delas causada por uma deficiência enzimática específica. Além disso, as MPS III e IV ainda são subdivididas em IIIA, B, C e D, IVA e B, de acordo com o defeito enzimático envolvido (Neufeld e Muenzer, 2001).

A forma de herança das MPS é do tipo mendeliana, autossômica recessiva, com exceção da MPS II (Síndrome de Hunter) que é herdada de forma recessiva ligada ao cromossoma X (Neufeld e Muenzer, 2001).

Até o momento são conhecidas onze enzimas lisossômicas (4 hexoglicosidases, 5 sulfatases, 1 endoglicosidase e 1 transferase), relacionadas com as MPS (Neufeld e Muenzer, 2001), que dão origem a doenças bastante heterogêneas sob o ponto de vista genético, clínico e, principalmente, bioquímico. Em cada desses distúrbios o GAG acumulado é quimicamente diferente e as diferenças clínicas pouco se sobressaem (McKusick *et al.*, 1993). No momento, o conjunto das informações disponíveis permite classificar as MPS em 7 tipos, conforme ilustrado na tabela 2.

Tabela 2: Classificação das MPS (Neufeld e Muenzer, 2001), modificado.

Nome	GAGs Urinários	Locus Cromossômico	Deficiência Enzimática	Principais Manifestações Clínicas
MPS IH ou Síndrome de Hurler	DS+HS	4P16.3	α -iduronidase	Opacidade de córnea, disostoses múltiplas, organomegalia, complicações cardíacas, retardo mental e morte na infância
MPS IS ou Síndrome de Scheie	DS+HS	4P16.3	α -iduronidase	Opacidade de córnea, disostoses múltiplas, inteligência normal e chegam à vida adulta
MPS IH/S ou Síndrome de Hurler/Scheie	DS+HS	4P16.3	α -iduronidase	Fenótipo intermediário entre MPS IH e IS
MPS II ou Síndrome de Hunter (severa)	DS+HS	Xq28	iduronato-sulfatase	Disostoses múltiplas, organomegalia, sem opacidade de córnea, retardo mental e morte antes dos 15 anos
MPS II ou Síndrome de Hunter (leve)	DS+HS	Xq28	iduronato-sulfatase	Inteligência normal, pequena estatura, sobrevive à vida adulta
MPS IIIA ou Síndrome de Sanfillippo A	HS	17q25.3	heparan N-sulfatase	Deterioração mental profunda, hiperatividade, manifestações somáticas relativamente leves
MPS IIIB ou Síndrome de Sanfillippo B	HS	17q21	α -N-acetilglicosaminidase	Fenótipo similar à MPS IIIA
MPS IIIC ou Síndrome de Sanfillippo C	HS	Não conhecido	Acetil-CoA: α -glicosaminide N-acetiltransferase	Fenótipo similar à MPS IIIA
MPS IIID ou Síndrome de Sanfillippo D	HS	12q14	N-acetilglicosamina 6-sulfatase	Fenótipo similar à MPS IIIA
MPS IVA ou Síndrome de Mórquio A	QS + condroitin 6-sulfato	16q24.3	galactose 6-sulfatase	Anomalias esqueléticas distintas, opacidade de córnea, hipoplasia odontológica
MPS IVB ou Síndrome de Mórquio B	QS	3p21.33	β -galactosidase	Espectro de severidade como na MPS IVA
MPS VI ou Síndrome de Maroteaux-Lamy	DS	5q13-q14	N-acetilgalactosamina 4-sulfatase (arilsulfatase B)	Disostoses múltiplas, opacidade de córnea, inteligência normal, sobrevivência até a adolescência nas formas mais severas
MPS VII ou Síndrome de Sly	DS+HS + condroitin 4,6-sulfato	7q21.11	β -glicuronidase	Disostoses múltiplas, hepatoesplenomegalia; grande espectro de severidade, incluindo forma fetal e neonatal
MPS IX	Hialuronan	3p21.2-p21.3	Hialuronidase	Pequena estatura, depósitos periarticulares

Legenda: DS, dermatan sulfato; HS, heparan sulfato; QS, queratan sulfato.

3 Mucopolissacaridose Tipo I

A mucopolissacaridose tipo I (MPS I) é uma doença autossômica recessiva caracterizada pela deficiência da enzima lisossômica α -L-iduronidase (IDUA) (Bach et al., 1972; Matalon e Dorfman, 1972). Esta deficiência é causada por mutações patogênicas em ambos os alelos do gene que codifica esta enzima. A função da IDUA é proporcionar a clivagem de resíduos de ácido L-idurônico que fazem parte da constituição do heparan sulfato e do dermatan sulfato. A deficiência desta enzima, portanto, acarreta o armazenamento destes substratos sulfatados nos tecidos dos indivíduos afetados e a sua excreção na urina (Neufeld e Muenzer, 2001), sendo a severidade clínica diretamente relacionada ao nível de acúmulo dos substratos (Conzelman e Sandhoff, 1983).

Esta deficiência leva a três fenótipos clínicos clássicos: I Hurler (IH), I Hurler/Scheie (IH/S) e I Scheie (IS) (McKusick et al., 1983). Porém, há uma considerável variação clínica dentro dos fenótipos clássicos que são resultantes de combinações de diferentes mutações observadas no gene da IDUA (Scott et al., 1993) e causam a redução na concentração, função ou variabilidade desta enzima (Ashton, et al, 1992).

3.1 Subtipos da MPS I

a) Síndrome de Hurler ou MPS IH

É conhecida como a forma mais severa entre todos os tipos de MPS I. Quando recém-nascidas, as crianças são clinicamente normais e, com o passar do tempo, vão ocorrendo alterações progressivas e severas, embora sejam freqüentes sinais e sintomas inespecíficos, como hérnia inguinal e/ou infecções

de vias aéreas superiores de repetição desde o nascimento. O diagnóstico clínico ocorre, em média, antes dos 2 anos de idade (Cleary e Wraith, 1995). O desenvolvimento neuropsicomotor costuma ser normal durante o primeiro ano de vida (Cleary e Wraith, 1995), sendo detectado atraso de desenvolvimento por volta dos 14 a 24 meses (Neufeld e Muenzer, 2001). As manifestações da doença ocorrem ao final do primeiro ano de vida, com o aparecimento de macrocefalia, face grosseira, cifose, giba tóraco-lombar (deformidades esqueléticas) e anquiloses dos membros. Por volta dos 2 ou 3 anos de idade desenvolve-se opacidade de córnea e a baixa estatura já bastante evidente. Hepatoesplenomegalia e hérnia umbilical tornam o abdome proeminente e o atraso nas aquisições psicomotoras estende-se até os 5 anos de idade. Há depósito excessivo de fibras elásticas e colágeno que são responsáveis pelo espessamento das meninges, podendo levar à hidrocefalia. Em exames radiológicos, as disostoses múltiplas são detectadas (Gilbert-Barness e Barness, 2000; Neufeld e Muenzer, 2001). Como nos demais tipos de MPS I, geralmente ocorre algum grau de surdez. As crianças severamente afetadas geralmente não ultrapassam 10 anos de vida, normalmente devido a infecções ou complicações cardíacas.

b) Síndrome de Scheie ou MPS IS

Esta variante se caracteriza por apresentar uma forma clínica mais moderada e o diagnóstico pode ser ignorado por vários anos, o qual geralmente é feito entre os 10 e 20 anos de idade. Os afetados possuem inteligência e crescimento ósseo normais, no entanto, a face grosseira é característica e torna-

se aparente por volta dos 5 anos de idade (Gilbert-Barness e Barnes, 2000; Neufeld e Muenzer, 2001). Neste caso, a alteração mais precoce e severa é a opacidade de córnea, seguida por envoltimentos articulares das mãos (mãos de garra), cotovelos, joelhos e pés. O problema cardíaco mais freqüente é a estenose valvar aórtica. Também podem ocorrer hirsutismo, hérnia umbilical e ingüinal, surdez, glaucoma e degeneração pigmentosa da retina. Este quadro se assemelha muito ao apresentado nas MPS III e VI e os pacientes freqüentemente alcançam a vida adulta (Neufeld e Muenzer, 2001).

c) Síndrome de Hurler/Scheie (MPS IH/S)

Estes pacientes apresentam o seu quadro clínico com manifestações intermediárias entre a MPS IH e a MPS IS. As complicações são menos severas que na Síndrome de Hurler e os afetados sobrevivem geralmente até a vida adulta. Possuem um desenvolvimento mais gradual dos sintomas, apresentando evidência clínica por volta dos 3 a 8 anos de idade (Muenzer, 1986; Neufeld e Muenzer, 2001). Geralmente os pacientes apresentam inteligência normal. Há deficiência de crescimento e aparecimento de hirsutismo e espessamento da pele. A face apresenta micrognatia. As limitações articulares são moderadas. Também pode ocorrer opacidade de córnea, surdez, hérnias e paquimeningite cervical (Neufeld e Muenzer, 2001). Os pacientes adultos podem desenvolver sintomas psicóticos.

3.2 Dados Epidemiológicos

As MPS representam um grupo de doenças que, em seu conjunto, possuem uma alta ocorrência no Brasil. Em um estudo realizado no Laboratório Regional de Erros Inatos do Metabolismo (LREIM) do Serviço de Genética Médica do HCPA, no período de 1982 a 1995, onde foram analisados 10.000 pacientes de alto risco para EIM provenientes de vários locais do Brasil, as MPS foram os distúrbios mais encontrados, perfazendo 32,6% dos EIM diagnosticados neste período. Entre elas, a MPS I contribuiu com 28,7% das MPS diagnosticadas, a MPS II com 12,8%, a MPS III com 22,3%, a MPS IV com 13,3%, a MPS VI com 20,7% e a MPS VII com 2,2% (Coelho et al, 1997).

A incidência da MPS verificada na literatura é extremamente variável, sendo estimada em 1/89.000 a 1/144.000 nascidos vivos (Lowry e Renwick, 1971; Lowry et al., 1990; Lavery, 1996; Nelson, 1996; Meikle et al., 1999; Poorthuis et al., 1999). A MPS I/H é a forma mais freqüente, com incidência estimada em 1/76.000 a 1/145.000 nascidos vivos (Lowry e Renwick, 1971; Lowry et al., 1990; Nelson, 1996), sendo as demais bem mais raras. Um estudo realizado por Matte et al. (2000) verificou que a incidência da MPS I, em Porto Alegre, é de 1/59.000 nascidos vivos.

A freqüência de heterozigotos para mucopolissacaridoses em geral é apresentada em poucos trabalhos descritos na literatura. Shapira et al. (1989) estimaram em 1/160 a proporção de heterozigotos para a MPS IH. Nos estudos realizados na população do RS, Matte (1999) estimou a proporção de heterozigotos em 1/100 indivíduos. Um estudo realizado pelo mesmo grupo de

trabalho envolvendo a doença gangliosidose GM1, nesta mesma população (Severini et al., 1999), mostrou também uma incidência muito maior que aquela presente na literatura (1/17.000 nascidos vivos e 1/70 heterozigotos). Estes resultados possivelmente refletem uma maior incidência destas duas doenças lisossômicas de depósito no sul do Brasil, já que as demais parecem possuir uma freqüência igual ou até menor que aquela observada na literatura (Coelho et al., 1997).

Entre janeiro de 1996 e julho de 1999, foram diagnosticados, no LREIM, 62 pacientes com MPS I, sendo que 57 possuíam confirmação enzimática. Um estudo realizado por Schwartz (2000), possibilitou a classificação clínica destes pacientes. De acordo com este trabalho, 34/57 pacientes foram classificados como possuindo a forma H, 20/57 como possuindo a forma não-H (pacientes Scheie e Hurler/Scheie) e 3/57 não foram classificados por falta de informações clínicas.

3.3 Aspectos Moleculares

O gene que codifica a IDUA está localizado no braço curto do cromossoma 4 na região 4p16.3 a 600 kb do telômero (Scott et al, 1990), próximo ao gene da Doença de Huntington (Neufeld e Muenzer, 2001). Possui, aproximadamente, 19 kb com 14 exons, que originam um mRNA de 2.3 kb (Scott et al., 1992).

Este gene possui uma seqüência de 1959 pb, codificando para um precursor de 653 aminoácidos. Porém, um peptídeo sinal de 26 aminoácidos é

clivado imediatamente antes da região amino-terminal da proteína madura. Desta forma, a proteína funcional possui 627 aminoácidos e seis sítios potenciais de glicosilação (Scott et al., 1991).

Até 2001 foram identificadas 57 mutações patogênicas diferentes no gene da IDUA e mais 30 mutações não patogênicas (HGMD, 2001). Segundo Le-Chen et al. (1999), um grande número de mutações no gene da IDUA são conhecidas na síndrome de Hurler, mas somente poucas são conhecidas nas síndromes de Scheie e de Hurler/Scheie, ou seja, existem mutações específicas para cada caso e estas podem causar redução na atividade enzimática, causando ou não redução no mRNA da IDUA ou mesmo redução na concentração, função ou viabilidade da IDUA (Aston et al., 1992).

Das 10 mutações patogênicas mais freqüentes presentes no gene da IDUA, seis foram identificadas nos pacientes brasileiros (Q70X, R89Q, A327P, R383H, W402X e P533R) (Matte et al, 2000). Além de possuir várias mutações já identificadas, o gene da IDUA é altamente polimórfico, o que dificulta a identificação molecular de heterozigotos.

3.4 Aspectos Bioquímicos

Em 1968 e 1969, Frantoni e colaboradores demonstraram que o acúmulo de GAGs, em cultura de fibroblastos de pacientes com MPS IH, podia ser corrigido por um fator presente na urina ou secreção de fibroblastos de indivíduos normais. O “fator corretivo” para a doença de Hurler, o qual se tratava de uma proteína de 87 KDa, foi purificado da urina de indivíduos normais cerca de

mil vezes (Barton e Neufeld, 1971). Em estudos posteriores, Bach e colaboradores (1972) demonstraram que o “fator corretivo” se tratava da enzima IDUA e que a sua atividade deficiente causava a Síndrome de Hurler, Scheie e Herler/Scheie (Bach et al., 1972; McKusick e Neufeld, 1983).

Shapiro e colaboradores (1976) descreveram a existência de duas formas da IDUA. Uma forma corretiva (“high-uptake”) que, adicionada à cultura de fibroblastos deficientes, fazia com que estes voltassem à atividade normal e outra não-corretiva (“low-uptake”). Clements et al. (1989) também separaram 2 formas da IDUA a partir de fígado humano, sem mostrar diferenças em suas atividades. A forma I, com bandas de 60 e 44 KDa e a forma II, com bandas de 65 e 49 KDa que, quando adicionada à cultura de fibroblastos deficientes, mostrou ser efetiva na correção da IDUA deficiente. Suas observações sugeriam uma única molécula precursora da IDUA, que é clivada em diferentes tamanhos que produzem fragmentos associados à molécula ativa da enzima.

Técnicas de visualização sensíveis têm sido usadas para estudar os processos de maturação da IDUA, que apresentam variações tecido-específicas das proporções maduras e formas precursoras (Clements et al., 1989).

Myerowitz e Neufeld, em 1981, imunoprecipitaram as duas maiores espécies catalíticas da IDUA de cultura de fibroblastos de indivíduos normais: a intracelular, de 66 KDa e a secretada, de 76 KDa, espécies “low” e “high-uptake”. Seus estudos demonstraram que a espécie de 76 KDa poderia ser convertida a espécies transitórias intracelulares de 75 KDa, que rapidamente poderia ser processada a uma forma intermediária de 72 KDa, novamente convertida à forma

madura de 66 KDa, em aproximadamente 5 dias. Constataram, também, que as formas de 76, 72 e 66 KDa não estavam presentes em pacientes com MPS IH.

Como Myerowitz e Neufeld (1981), Taylor et al. (1991) obtiveram um precursor de 81 KDa da enzima de fibroblastos normais que, por 24 horas, passou a formas intermediárias de 76, 70, e 69 KDa. Verificaram também que, após 3 horas, uma pequena parte da IDUA foi secretada ao meio de cultura, sob uma forma de 82 KDa. Essas diferenças de pesos moleculares encontradas por esses autores possivelmente são devido às diferentes técnicas analíticas usadas.

Clements et al. (1985) purificaram a IDUA de fígado humano e encontraram uma enzima nativa de peso molecular de 65 KDa. Rome et al. (1978) trabalharam com a purificação da IDUA de rim e obtiveram espécies de pesos moleculares 30 e 60 KDa, a partir da sedimentação da enzima nativa.

Schuchman et al. (1984) separaram de pulmão humano, através de cromatografia de troca iônica, 2 formas da IDUA, diferindo na composição dos polipeptídeos. O peso molecular das formas nativas foram 85 KDa (high-uptake) e 68 KDa (low-uptake), sendo que a "high-uptake" possui mais arginina, glicina, alanina, glutamato/glutamina, leucina, histidina, isoleucina e prolina. Essas diferenças na composição de aminoácidos sugeriram que a "high-uptake" contém resíduos adicionais que são, em parte, responsáveis por sua associação à membrana e por sua propriedade endocítica. Possivelmente, o alto peso molecular da forma "high-uptake" representa uma espécie precursora altamente fosforilada, enquanto que a forma "low-uptake" tem sido processada e compartimentalizada no lisossomo. O componente de 44 KDa é a forma madura e altamente resistente à autodigestão lisossomal.

Unger et al. (1994), no caminho da terapia por reposição enzimática, produziram uma IDUA recombinante a partir de células de ovários de hamster, nas quais foi introduzida um vetor com o gene da IDUA humana. Esta enzima mostrou ser endocitada à cultura de fibroblastos com MPS I via receptores de manose-6-fosfato, corrigindo o fenótipo destas células, que passaram a digerir os GAGs acumulados nos lisossomos. A IDUA recombinante possuía peso molecular de 85 KDa e foi processada a 74 KDa. Seu pH e parâmetros cinéticos diferem da IDUA de fígado.

A atividade da enzima da forma precursora da IDUA mostra um aumento quando NaCl é acrescentado ao meio de incubação. Porém, isso não foi observado com a IDUA madura. Na forma madura, o NaCl age como inibidor. O íon cobre é inibidor da enzima madura.

Assim como todas as enzimas lisossomais, a IDUA apresenta sítios de glicosilação, aos quais são adicionados resíduos de manose-6-fosfato, responsáveis pela endocitose da proteína no lisossomo, bem como a presença de múltiplas formas durante seu processo de maturação.

Os estudos demonstram que os valores cinéticos da IDUA são diferentes conforme o tecido estudado e o substrato usado. Rome et al. (1978) determinaram o Km da enzima em rim de indivíduos normais em 1,5 mM para o substrato fenil iduronídeo e 9 mM para o substrato anidromanitol iduronídeo, com valores de Vmax de 16 $\mu\text{mol/mg}$ de proteína/min e 270 $\mu\text{mol/mg}$ de proteína/min, respectivamente. Estes autores, ao compararem seus resultados com os de Shapiro e colaboradores (1976), verificaram que estes eram mais altos. Em estudos de pH, Rome et al.

(1978) encontraram pH ótimo de 4,0 para ambos substratos usados. Shapiro et al. (1976) encontraram valores de pH ótimo de 3,6 para amostras de urina.

Rome et al. (1978) também estudaram a ação de inibidores sobre a atividade da IDUA. Verificaram que esta é completamente inibida por p-cloromercuribenzoate e íons cobre e, em menores proporções, por EDTA e cátions divalentes (Co^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , e Fe^{2+}).

Hopwood e Muller (1979 e 1984) encontraram diferenças nas propriedades cinéticas da IDUA presente em fibroblastos de indivíduos com MPS IS e H. Porém, os fenótipos intermediários não foram totalmente discriminados por este caminho. Verificaram, também, que a V_{max} é cerca de 40 vezes menor para a enzima de pacientes com MPS I que naquela de indivíduos normais, enquanto que o K_m de indivíduos com MPS IH é 4 a 10 vezes maior que nos controles, não sendo diferente para MPS IS e H. Demonstraram, ainda, que a IDUA de indivíduos portadores da Síndrome de Scheie é mais termoestável que a dos indivíduos com Hurler, sendo a IDUA de indivíduos normais a mais instável ao calor.

Os autores acima também verificaram que íons sulfato realizam uma maior inibição na atividade da IDUA de indivíduos normais e naqueles com MPS IS e, em menor quantidade, em indivíduos MPS IH. Íons cloreto inibem a atividade IDUA similarmente em todos os grupos. Em contrapartida, a adição de cloreto de sódio aumenta o K_m da enzima de indivíduos com MPS IS e de indivíduos normais.

Clements et al. (1985) e Freeman e Hopwood (1992) caracterizaram a enzima IDUA de fígado humano normal, estabelecendo os valores de K_m , V_{max} e pH ótimo usando vários tipos de substratos. Clements et al. (1985) também estudaram o efeito de íons sobre a atividade da IDUA, verificando que Na_2SO_4 e

NaCl são inibidores do tipo competitivo e CuCl_2 não competitivo. Encontraram um K_i para o substrato 4-metilumbeliferil- α -L-iduronide de 192; 9,5 e 0,500 para os íons NaCl, Na_2SO_4 e CuCl_2 , respectivamente.

Em estudos realizados por Fujibayashi et al., 1984, foi demonstrada a existência de 2 formas distintas para a IDUA de fibroblastos capazes de serem diferenciadas cineticamente. O tipo IH possuiria a forma A, mais termoestável, e o tipo IS a forma B, menos termoestável, que foram separadas por cromatografia de DEAE celulose.

Den-Tandt e Scharpe (1989) realizaram estudos também envolvendo a enzima IDUA de plasma e leucócitos de indivíduos normais, usando o substrato fluorimétrico 4-metilumbeliferil- α -L-iduronídeo, em que verificaram que a mesma era inibida por fenil- α -L-iduronídeo, heparina, CaCl_2 , Na_2SO_4 e sulfato de heparitina. Determinaram o K_m da IDUA de leucócitos de indivíduos normais em 0,33 mM, com variação de 0,24 a 0,45 mM e pH ótimo em 3,5. Em plasma, obtiveram pH ótimo em 4,0 e um K_m que variou entre 0,32 e 1,25 mM, com média de 0,59, verificando, também, que plasma constituía uma amostra extremamente lábil ao calor.

Recentemente, Clements et al. (2000) demonstraram diferenças bioquímicas na IDUA de pacientes com MPS I, capazes de separar estes indivíduos. Esta separação coincidia com a mutação envolvida e a clínica do paciente, severa ou branda. Assim, estes autores podiam, através de certos parâmetros bioquímicos da IDUA de fibroblastos, predizer o fenótipo dos indivíduos. Segundo os autores, esta é uma metodologia confiável mesmo não se conhecendo o genótipo dos pacientes.

3.5 Diagnóstico

O diagnóstico da MPS I é estabelecido pela demonstração do acúmulo de GAGs urinários (HS e DS) e confirmado pela redução da atividade da enzima IDUA presente em fígado (Matalon e Dorfman, 1972), urina (Matalon e Dorfman, 1972), leucócitos (Dulaney et al., 1976), fibroblastos (Matalon e Dorfman, 1972), plasma (Singh et al., 1974), células do líquido amniótico e vilosidades coriônicas (Hall e Neufeld, 1973).

Para medir a atividade da enzima IDUA, foi primeiro utilizado o substrato fenil- α -L-iduronídio (Weissmann e Santiago, 1972; Hall e Neufeld, 1973). Em 1979, Hopwood e colaboradores utilizaram o substrato fluorogênico 4-metilumbeliferil- α -L-iduronídio, que se mostrou sensível e confiável para o diagnóstico, com a vantagem de ser mais específico que o primeiro.

Na medida da atividade desta enzima, são preferidas as amostras de plasma e leucócitos, por serem mais facilmente coletadas, manipuladas e oferecerem um diagnóstico mais rápido ao paciente, visto que não é necessário o cultivo celular, o que evita, também, variações na cultura, decorrentes da preparação das amostras, diminuindo os erros de ensaio (Klijer et al., 1981). Porém, a enzima possui atividade igualmente baixa em pacientes de com várias manifestações clínicas (Hopwood e Muller, 1979; Muller e Hopwood, 1984).

O diagnóstico molecular é difícil, devido ao grande número de mutações no gene da IDUA já descritas (mais de 50), o que inviabiliza esta técnica para o uso na rotina como teste de triagem para MPS I (Neufeld e Muenzer, 2001). Porém, o conhecimento da mutação do caso índice é de grande

validade, principalmente para o diagnóstico pré-natal (Neufeld e Muenzer, 2001).

3.6 Tratamento

O tratamento da MPS I se limita a medidas gerais de suporte, devendo ser realizado por uma equipe multidisciplinar para efetuar o manejo das complicações associadas à doença com máxima eficácia. Atualmente, os tratamentos oferecidos são paliativos e sintomáticos.

O transplante de medula óssea (TMO) é uma opção em casos selecionados, onde a relação risco/benefício é favorável. Começou a ser utilizado como uma correção do defeito enzimático a partir de 1979 (Hobbs et al., 1981). Está baseado no fato de que a enzima produzida pelas células transplantadas seja liberada no plasma, cujas concentrações enzimáticas passam a ser normais, podendo ser absorvida pelas células deficientes do paciente, eliminando, assim, o depósito de GAGs nos lisossomas celulares (Navarro et al., 1991).

O TMO em pacientes com MPS IH com doença neurológica em estágio pré-clínico ou precoce (até 2 anos de idade), possibilita uma atenuação das dismorfias faciais e um efeito positivo em relação ao desempenho intelectual, por tornar mais lenta a deterioração mental (Whitley et al., 1993; Field et al., 1994; Peters et al., 1996 e 1998; Krivit et al., 1996; Vellodi et al., 1997; Flemming et al., 1998; Guffon et al., 1998; Neufeld e Muenzer, 2001). Os transplantes também mostram um efeito benéfico em relação às alterações viscerais, reduzindo os quadros de hepatoesplenomegalia e opacidade de córnea (Hobbs et al., 1981).

Como os riscos inerentes ao transplante são altos e a dificuldade de obter-se um doador compatível é muito grande, outra alternativa de tratamento é a reposição enzimática, que tem demonstrado alta eficácia em relação a outras doenças lisossômicas de depósito. Em estudos *in vitro* (Unger et al., 1994), foi demonstrado que, quando fibroblastos de indivíduos com MPS I são incubados com IDUA modificada, há uma correção no estoque de GAGS destas células, corrigindo, assim, o defeito bioquímico. Em estudos com modelos animais (Shull et al., 1994; Kakkis et al., 1996; Clarke et al., 1999), foi demonstrada a diminuição de GAGs acumulados e resposta imunológica à enzima administrada. Este fato torna-se importante e dificulta a terapia enzimática em humanos.

No momento, experimentos de tratamento da MPS I com humanos estão em andamento, com infusões intravenosas semanais de IDUA recombinante (Kakkis et al., 1999). Kakkis et al. (2001) trataram 10 pacientes com MPS I c/ IDUA recombinante por 52 semanas e observaram regressão da hepatoesplenomegalia. Esta parece ser a terapia de um futuro próximo para MPS I, embora não tenham sido observados efeitos positivos sobre aqueles indivíduos cujas alterações neurológicas já estejam instaladas.

Outra alternativa de tratamento em desenvolvimento é a terapia gênica. Ashton et al. (1992) construíram um vetor retroviral com o gene da IDUA que, ao ser transferido para fibroblastos em cultura, corrigiu o defeito bioquímico presente nestas células. Estudos de transferência de vetores retrovirais para células CD34+ (Fairbairn et al., 1996; Huang et al., 1996) observaram reversão dos efeitos fenotípicos em macrófagos e aumento de produção de IDUA pelas células CD34+ de cerca de 6 vezes em relação aos controles. Em estudos clínicos

envolvendo a transferência de vetores retrovirais contendo o DNAC da IDUA para mioblastos de modelos caninos, houve resposta imunológica contra as células produtoras de IDUA normal e os vetores virais (Shull et al., 1996). A transferência para células hematopoiéticas humanas primitivas teve uma eficiência de 18-23% com aumento de atividade enzimática nas células derivadas das que foram modificadas (Huang et al., 1997). Em outro trabalho, em que três pacientes foram submetidos a transplante de medula óssea autóloga geneticamente modificada, a atividade da enzima IDUA de sangue periférico voltou a níveis não detectáveis quatro semanas após o transplante (Fairbairn et al., 1999).

Outras medidas terapêuticas, como o transplante de fibroblastos, não se mostraram eficazes para mudar o curso clínico da doença (Gibbs et al., 1983).

3.7 Identificação de Heterozigotos

A detecção de heterozigotos é a medida mais importante para a prevenção de indivíduos afetados nas famílias de alto risco para MPS I. De acordo com Neufeldt e Muenzer (2001), a detecção de heterozigotos é um dos itens assistenciais mais requisitados pelas famílias destes pacientes.

O comportamento bioquímico da enzima IDUA em heterozigotos ainda não está muito bem estabelecido. Somente com a medida da atividade da enzima não é possível, na maioria das vezes, identificarmos um heterozigoto, pois existe sobreposição da atividade da IDUA destes indivíduos com aquela de indivíduos normais (Neufeld e Muenzer, 2001).

O mesmo ocorre com muitas hidrolases lisossômicas que estão deficientes nas doenças lisossômicas de depósito. Levando isto em consideração, Sopelsa et al. (2000) elaboraram um protocolo de caracterização bioquímica e o aplicaram em heterozigotos para gangliosidose GM1. Estes autores observaram que a enzima beta-galactosidase de heterozigotos, embora possuísse atividade sobreposta àquela de indivíduos normais, apresentava um comportamento bioquímico distinto que permitia identificá-la em uma população de alto risco para a doença.

A revisão bibliográfica nos mostra que os estudos bioquímicos da enzima IDUA foram sendo abandonados na década de 80, quando o advento da biologia molecular passou a ser visto como o método mais promissor para identificar as doenças de cunho genético e a saída para a cura das mesmas, com o uso da terapia gênica. Assim, os grupos que se dedicavam a estes estudos bioquímicos se renderam à biologia molecular.

Com o passar do tempo, verificou-se que a identificação de heterozigotos por métodos bioquímicos ainda é preferida, já que em doenças como a MPS I a identificação molecular é difícil, pois consome um grande tempo, necessita-se conhecer a mutação do caso índice, o que muitas vezes não é possível e a cada trabalho publicado são descritas novas mutações. A identificação molecular seria um excelente recurso se pudéssemos realizar em todos os possíveis heterozigotos o seqüenciamento de todo o gene da IDUA, uma realidade tecnológica ainda não disponível, principalmente em países do terceiro mundo.

Portanto, a identificação de heterozigotos para MPS I, através de parâmetros bioquímicos seria bastante útil e deve ser investigada. Neste particular, o trabalho de Clements et al. (2000) já demonstrou algumas características bioquímicas distintas entre pacientes com MPS I severa, leve e intermediária.

OBJETIVOS

Objetivo Geral:

Desenvolver uma metodologia bioquímica para detectar indivíduos heterozigotos para Mucopolissacaridose do Tipo I dentro de uma população de alto risco.

Objetivos Específicos:

1. Caracterizar a enzima α -L-iduronidase (IDUA) presente em amostras de plasma de indivíduos normais e heterozigotos obrigatórios para Mucopolissacaridose do Tipo I Hurler, Scheie e Hurler/Scheie quanto a:
 - 1.1. Atividade enzimática;
 - 1.2. pH ótimo de funcionamento;
 - 1.3. Km;

- 1.4. Velocidade máxima;
 - 1.5. Cotangente do ângulo α ;
 - 1.6. Termoestabilidade;
2. Caracterizar a enzima α -L-iduronidase (IDUA) presente em amostras de leucócitos de indivíduos normais e heterozigotos obrigatórios para Mucopolissacaridose do Tipo I Hurler, Scheie e Hurler/Scheie quanto a:
- 2.1. Atividade Enzimática;
 - 2.2. pH ótimo de funcionamento;
 - 2.3. Km;
 - 2.4. Velocidade máxima;
 - 2.5. Termoestabilidade.
3. Observar a resposta da IDUA de plasma de indivíduos normais e heterozigotos obrigatórios para Mucopolissacaridose do Tipo I Hurler, Scheie e Hurler/Scheie quando cloreto de sódio, EDTA e cloreto de cobre são adicionados ao meio de incubação.

CAPÍTULO 1

**Detection of Mucopolysaccharidosis Type I Heterozygotes Based on the
Biochemical Characteristics of Leucocyte α -L-iduronidase**

Jovana Mandelli, Alessandro Wajner, Ricardo F. Pires, Roberto Giugliani and
Janice C. Coelho

Artigo aceito para publicação no Archives of Medical Research (2001)

**Detection of Mucopolysaccharidosis Type I Heterozygotes Based on the
Biochemical Characteristics of Leucocyte α -L-iduronidase**

Jovana Mandelli^{*,**}, Alessandro Wajner^{*,**}, Ricardo F. Pires^{*}, Roberto Giugliani^{*,***}
and Janice C. Coelho^{*,**}

^{*}Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brasil

^{**}Departamento de Bioquímica, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil

^{***}Departamento de Genética, IB, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil

Corresponding author: Janice Carneiro Coelho, PhD
Serviço de Genética Médica
Hospital de Clínicas de Porto Alegre
Rua Ramiro Barcelos, 2350
Porto Alegre – RS – Brasil
90035-003
phone: + 55 51 316 8011
fax: + 55 51 316 8010
e-mail: jcoelho@hcpa.ufrgs.br

Abstract

Background. In the present study we characterized biochemically the enzyme α -L-iduronidase (IDUA) of leukocytes from normal individuals and from mucopolysaccharidosis I (MPS I) heterozygotes and compared these characteristics in order to discriminate them into two different groups.

Methods. We measured IDUA activity in leukocytes fluorimetrically using 4-methylumbelliferyl-(4UM)- α -L-Iduronide as an artificial substrate. Optimum pH, K_m , V_{max} and thermostability of the enzyme at 50°C were determined.

Results. On the basis of leukocyte IDUA activity, we divided the heterozygotes into two groups, one (group 1) with activity below that detected in controls, and the other with activity similar to that of normal individuals (group 2). The optimum pH for IDUA was 2.7 for normal individuals and 2.6 to 2.8 for heterozygotes. With respect to K_m , there was a difference only between the value for normal IDUA (0.60 mM) and the value for group 2 (0.38 mM), while group 1 showed a statistically similar value (0.49 mM). The V_{max} of the reaction discriminated the three groups in a highly effective manner. The IDUA of normal individuals had a higher V_{max} (60.98 nmol/h.mg protein) than the enzyme of group 1 heterozygotes (28.66 nmol/h.mg protein) and the enzyme of group 2 (31.78 nmol/h.mg protein). When the IDUA from the 3 groups was pre-incubated at 50°C, we observed that the IDUA of both group 1 and group 2 was significantly more thermostable than the IDUA of normal individuals.

Conclusions. Determination of IDUA activity alone is not sufficient to discriminate between MPS I heterozygotes and normal individuals since a considerable overlap occurs between them. Our study showed that leukocyte IDUA from MPS I

heterozygotes differed from the normal enzyme in terms of optimum pH, K_m and V_{max} of the reaction and thermostability at 50°C. These parameters provide a simple and reliable tool for the detection of carriers for MPS I.

Key words: Leukocytes, α -L-iduronidase, mucopolysaccharidosis type I, heterozygote detection

Introduction

Type I mucopolysaccharidosis (MPS I) is an autosomal recessive disorder with three clinically delineated types, Hurler (MPS IH), Scheie (MPS IS) and Hurler/Scheie (MPS IH/S), which result from the deficient activity of the lysosomal hydrolase α -L-iduronidase (IDUA) (E.C. 3.2.1.76), leading to the accumulation of the glycosaminoglycans, dermatan sulfate and heparan sulfate, in several tissues (1) .

MPS IH is a progressive and severe disease characterized by multiple dysostosis, mental retardation, coarse facies, macrocephaly, short stature, ankylosis of the limbs, corneal clouding, hepatosplenomegaly, and cardiac complications which lead to patient death during the first decade of life (1). In contrast, affected individuals with MPS IS have normal intelligence and lifespan and only mild skeletal deformities, stiff joints and corneal opacity. Patients with MPS IH/S present an intermediate phenotype (1).

MPS I is diagnosed by the measurement of IDUA activity, which is markedly deficient in all three clinical types. IDUA activity can be determined in several materials (2-5), but plasma and leukocytes are preferred because they can be easily collected and manipulated, allowing a rapid diagnosis (3).

There is no effective treatment for this disease and the identification of heterozygotes can allow genetic counseling in families which already have an affected child. According to Neufeldt and Muenzer (1), heterozygote detection is the service most often requested by the families of affected patients.

Heterozygotes for lysosomal storage diseases like MPS I have enzyme activity levels that overlap with those of normal subjects (6) and

molecular identification of MPS I carriers is a difficult and time-consuming task because the gene is highly polymorphic and mutation analysis must be carried out first in an index case not always available (7). Thus, other methods should be considered, like the observation of the biochemical behaviour of IDUA in the three types of MPS I heterozygotes and its comparison with the behaviour of the enzyme in normal individuals.

The objective of the present study was to identify MPS I carriers based on the biochemical characteristics of leukocyte IDUA since this could be an useful method for the detection of these individuals in populations at high risk for this disease.

Materials and Methods

Samples. Leukocytes samples were obtained from peripheral venous blood collected with heparin. Samples from normal individuals were obtained from volunteer blood bank donors. Samples from heterozygotes were obtained from the parents of patients with MPS I. This research was carried out in accordance with the Declaration of Helsinki of the World Medical Association and was approved by the Ethics Committee of Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Informed consent was obtained from all subjects who participated in this study.

Leukocyte preparation. Leukocytes were obtained by sedimentation of blood cells with a dextran-citric acid-glucose mixture by the method of Skoog and Beck (8). After centrifugation with 0.9% sodium chloride, the supernatant was discarded and the leukocyte pellet was removed and kept frozen at -40°C before enzyme determination.

Enzyme assays. Leukocyte enzyme activity was determined as described by Hopwood et al (9) using 4-methylumbelliferyl (4MU)- α -L-iduronide as substrate. The assay mixture contained 10 μL of 2 mM substrate, 10 μL of 0.1 M sodium formate and 10 μL of leukocytes. We used 50-120 μg protein (9). Leukocyte enzyme assays were incubated at 37°C for one hour. The reaction was stopped with 1.5 mL of 0.5 M glycine-sodium hydroxide buffer, pH 10.3, and fluorescence was read with a Hitachi F-2000 spectrofluorometer (excitation

and emission wavelength of 365 and 450 nm, respectively). All assays were performed in duplicate.

For optimum pH determination we used sodium formate buffer at pH varying from 2.2 to 3.0.

For the determination of the Michaelis-Menten plot (substrate curve) we used final substrate concentrations of 0.1 to 3.0 mM. After linearity was determined, K_m and maximum velocity (V_{max}) were determined using substrate concentrations of 0.1 to 1 mM. These results were calculated using a Lineweaver and Burk (10) plot, with a correlation coefficient of $r = 0.99$ for all curves.

For the study of enzyme heat stability at 50°C, samples were pre-incubated at 50°C for 15, 30 and 60 minutes before adding 2 mM substrate. The reaction was then processed at 37°C for 1 hour.

Statistical analysis. Data are reported as mean \pm SD. One-way ANOVA was used to compare groups, followed by the Tukey test when necessary. The analysis was performed using the statistical software package SPSS/PC+ and the level of significance was set at $p < 0.05$.

Results

Table 1 shows the enzyme activity of all individuals analyzed. In the control group, the enzyme activity ranged from 29.10 to 56.13 nmol/h.mg protein. We observed that some heterozygotes presented an enzyme activity within this range, while others showed a lower value, indicating that there is a substantial overlap between these two groups.

On the basis of these results, we assigned our subjects to three groups: a control group, a carrier group whose IDUA activity was lower than control (group 1) and a third group (group 2) consisting of carriers whose IDUA activity was similar to that of controls. For optimum pH, K_m and V_{max} determination and thermostability studies, we considered these three groups separately.

Optimum pH was 2.7 for control subjects and 2.6, 2.7 or 2.8 for the other two groups (Table 1). A graphic with the optimum pH of some representative individuals of these groups is presented in Figure 1.

The K_m of IDUA was 0.60 ± 0.09 mM, ranging from 0.46 to 0.69 mM, in leukocytes from normal individuals, 0.49 ± 0.17 mM, ranging from 0.22 to 0.69 mM, in leukocytes from group 1 heterozygotes, and 0.38 ± 0.08 mM, ranging from 0.27 to 0.50 mM, in leukocytes from group 2 heterozygotes. There was a significant difference only between the control group and group 2 heterozygotes [$F(2,18)=7.16$; $p<0.005$]. These results were calculated using the Lineweaver and Burk plot and can be seen in Figure 2.

Figure 2 also shows the V_{max} values for the reactions in leukocytes, which were 60.98 ± 9.03 nmol/h.mg protein for IDUA from normal individuals and

28.66 \pm 15.7 nmol/h.mg protein and 31.78 \pm 15.4 nmol/h.mg protein for the enzyme from group 1 and 2 heterozygotes, respectively. V_{max} for the control enzyme was significantly higher than for the enzyme of group 1 and 2 heterozygotes [$F(2,18) = 25.57$; $p < 0.001$].

When we incubated leukocyte samples from normal individuals at 50°C we obtained a residual activity of only 30.89 \pm 6.4% (ranging from 22.49 to 35.98%) after 15 minutes compared to the samples not submitted to partial denaturation (100%). At 30 minutes of pre-incubation, the residual activity was 21.8 \pm 1.58% and at 60 minutes IDUA was practically denatured, with a residual activity of only 1.63 \pm 0.1% (Figure 3). This inactivation was significant starting at 15 minutes of pre-incubation [$F(4;15)=61.00$; $p < 0.01$]. In group 1 heterozygotes, the samples pre-incubated at 50°C for 15 minutes had a residual IDUA activity of 66.25 \pm 10.03% (ranging from 52.89 to 75.35%), whereas the samples treated for 30 and 60 minutes at the same temperature showed 45.44 \pm 10.27% and 13.96 \pm 3.87% of the 100% activity, respectively (Figure 3). Statistical analysis of the results showed a significant inactivation of the enzyme at the times studied [$F(3,12)=94.49$, $p < 0.001$] and this inactivation was already present after 15 minutes of pre-incubation (Figure 3).

Samples from group 2 individuals showed inactivation at 50°C, beginning after 15 minutes of pre-incubation [$F(3,16)=176.86$; $p < 0.001$]. At that time point, the samples had 62.01 \pm 8.08% of residual activity (ranging from 48.56 to 69.93%). After 30 and 60 minutes, the residual activity of leukocyte IDUA was 40.21 \pm 3.34% and 19.28 \pm 7.61%, respectively (Figure 3).

When we compared controls with heterozygotes, we observed that the enzyme inactivation from both heterozygote groups was significantly lower at all times of pre-incubation analyzed [$F(2,9)=33.15$; $p<0.001$; $F(2,9)=20.39$; $p<0.001$ and $F(2,9)=15.55$; $p<0.001$; 15, 30 and 60 min, respectively]. This shows that the leukocyte enzyme from heterozygotes was more heat stable than the enzyme from normal individuals.

Discussion

Detection of MPS I carriers is very important for the prevention of affected individuals in high risk families and constitutes one of services more frequently requested by those families, as there is no efficient treatment for this inborn error of metabolism and the prognosis is poor (1). This detection can be performed by biochemical or molecular techniques. However, carrier detection by these techniques is a very difficult task since more than 50 different mutations (11) have been identified in the highly polymorphic IDUA gene (7).

Studies already demonstrated that the biochemical characteristics of enzymes from normal individuals and heterozygotes could be highly useful for the detection of carriers of lysosomal storage diseases (12).

Detection of MPS I heterozygotes by the level of IDUA activity does not seem to be reliable since values for normal individuals and heterozygotes often overlap. As expected, this was observed in the present study. However, 14 of the 26 heterozygotes were identified by this determination since their IDUA activity was approximately 50% of that observed in the control group. To detect the other 12 heterozygotes for MPS I whose IDUA activity overlapped with normal activity, we performed an alternative study of the biochemical characteristics of the enzyme. By evaluating these characteristics we were able to identify all carriers.

Leukocyte IDUA from normal individuals showed maximum activity at pH 2.7. The enzyme of heterozygotes showed maximum activity at various pH values, i.e., 2.6, 2.7 and 2.8. Of the 26 IDUA carriers, only 7 had a 2.7 optimum pH, while all other samples presented an optimum pH differing from that

presented by the control group IDUA. Of these 7 samples, 4 had been previously identified because they presented a reduced activity compared with normal IDUA activity. Therefore, only 3 carriers remained unidentified.

Km was different between group 2 heterozygotes and the control group and, therefore, this parameter was chosen to identify MPS I heterozygotes who had the same IDUA activity as normal subjects. We did not observe a difference between control group and group 1 because the Km range of group 1 was very wide, a fact possibly affecting statistical comparison.

In terms of the Vmax of reaction, we observed that both heterozygote groups (1 and 2) differed from the normal group with a lower IDUA Vmax than the normal group, permitting a good discrimination of all MPS I heterozygotes.

The above results cannot be compared to those obtained in other studies, since, to our knowledge, no studies have been conducted on leukocyte IDUA from MPS I heterozygotes.

The last parameter evaluated was IDUA thermostability at 50°C. The IDUA from both heterozygote groups (1 and 2) was more resistant to denaturation than normal IDUA. Hopwood and Muller (9) and Fujibayashi et al. (13), in a study that compared normal IDUA with fibroblast IDUA from MPS I-affected individuals (homozygotes), showed that normal IDUA was more heat labile than IDUA from MPS I homozygotes

Our data show that, after pre-incubation at 50°C for only 15 minutes before substrate addition, normal IDUA had approximately 40% of its original activity, while the carrier enzyme had more than 50% activity compared with the activity of the enzyme not submitted to partial denaturation (100% activity). All heterozygotes studied were separated by this method. The separation is evident when we observe the range of group 1 (52.89 to 75.35%) and group 2 (48.56 to 69.93%) of heterozygotes compared with control group range (22.49 to 35.98%).

Our study showed that leukocyte MPS I IDUA from heterozygotes differed from the normal enzyme in terms of optimum pH, Km and Vmax of the reaction and of thermostability at 50°C. These parameters are useful for the detection of MPS I carriers. Among them, pre-incubation of the enzyme at 50°C for 15 minutes can be a simple and powerful test for the detection of MPS I heterozygotes being specially useful for carrier screening in families at risk, even in non-specialized diagnostic laboratories.

We must to emphasize that we did not know the mutations presented by MPS I carriers studied in this work, therefore the sample evaluated can be genetically heterogeneous. In this way, the results obtained in this specific sample could not to be applicable to all MPS I carriers.

Acknowledgements

We are grateful to CNPq, FINEP/HCPA and PRONEX-MCT (Brazilian Research Agencies) for financial support

References

1. Neufeld EF, Muenzer J. The Mucopolysaccharidosiss. In Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease*. 7th edn. New York, McGraw-Hill; 1995. p. 2465.
2. Matalon R, Dorfman A. Hurler's syndrome, and α -L-iduronidase deficiency. *Biochem Biophys Res Commun* 1972;47:959.
3. Singh J, Niebes P, DiFerrante N. A method for α -L-iduronidase assay. *FEBS Lett* 1974;45:248.
4. Dulaney JT, Milunski A, Moser HW. Detection of the carrier state of Hurler's syndrome by assay of α -L-iduronidase in leukocytes. *Clin Chim Acta* 1976;69:305.
5. Hall CW, Neufeld EF. α -L-iduronidase activity in cultured skin fibroblast and amniotic fluid cells. *Arch Biochem Biophys* 1973;158:817.
6. Shapiro LJ. Current status and future direction for carrier detection in lysosomal storage diseases. In: Callahan JW, Lowden JÁ, eds. *Lysosomes and Lysosomal Storage Disease*. New York, Raven Press; 1981. p.343.
7. Lee-Chen GJ, Lin SP, Tang YF, Chin YW. Mucopolysaccharidosis type I: characterization of novel mutations affecting alpha-L-iduronidase activity. *Clin Genet* 1999;56:66.
8. Skoog WA, Beck WS. Studies on the fibrinogen, dextran and phytohemagglutinin methods of isolating leukocytes. *Blood* 1956;11:436.
9. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265.
10. Lineweaver H, Burk D. The determination of enzyme dissociation constants. *J Am Chem Soc* 1934;56:658.

11. Scott HS, Bunge S, Gal A, Clarke LA, Morris CP, Hopwood JJ. Molecular genetics of mucopolysaccharidosis type I: diagnostic, clinical and biological implications. *Hum Mut* 1995;6:288.
12. Sopelsa AMI, Severini MHA, Silva, CMD, Tobo PR, Giugliani R, Coelho JC. Characterization of β -galactosidase in leukocytes and fibroblasts of GM1 gangliosidosis heterozigotes compared to normal subjects. *Clin Biochem* 1999;33:125.
13. Fujibayashi S, Minami R, Ishikawa Y, Wagatsuma K, Nakao T, Tsugawa S. Properties of α -L-iduronidase in cultured skin fibroblast from α -L-iduronidase-deficient patients. *Human Genet* 1984;65:268.

Figure Legends




Figure 1. Effect of pH on plasma IDUA activity in  controls,  group 1 heterozygotes and  group 2 heterozygotes. In controls, data are mean of 7 individuals and in each group of heterozygotes there are 1 representative individual per pH curve.




Figure 2. Lineweaver and Burk plot for α -L-iduronidase in leukocytes samples from normal individuals and from MPS I heterozygotes:  leukocytes from normal individuals (n = 7);  leukocytes from group 1 heterozygotes (n = 14);  leukocytes from group 2 heterozygotes (n = 12). S = substrate; v = velocity. Data are mean of all individuals.




Figure 3. Effect of pre-incubation at 50°C on α -L-iduronidase activity in leukocytes samples from normal individuals and from MPS I heterozygotes:  leukocytes from normal individuals (n = 7);  leukocytes from group 1 heterozygotes (n = 14);  leukocytes from group 2 heterozygotes (n = 12). Enzyme activity is reported as percent of residual activity in relation to sample not submitted to pre-incubation at 50°C (100%). Data are mean of all individuals.

Table 1: IDUA activity and its optimum pH in leukocytes of normal (control group) and heterozygotes (groups 1 and 2) MPS I individuals.

	Sample	IDUA activity nmol/h/mg of protein	Optimum pH
Control group (n = 7)		47.71 ± 14.71	2.7
Group 1	1	26.6	2.6
	2	25.6	2.6
	3	5.9	2.8
	4	5.3	2.8
	5	22.5	2.6
	6	18.2	2.8
	7	8.9	2.6
	8	20.5	2.6
	9	26.0	2.8
	10	14.6	2.8
	11	21.5	2.7
	12	11.7	2.7
	13	17.1	2.7
	14	10.1	2.7
Group 2	15	34.1	2.8
	16	53.5	2.8
	17	33.2	2.6
	18	51.7	2.8
	19	36.7	2.6
	20	34.4	2.6
	21	42.9	2.8
	22	29.3	2.6
	23	30.6	2.6
	24	58.7	2.7
	25	36.1	2.7
	26	40.5	2.7

Figure 1

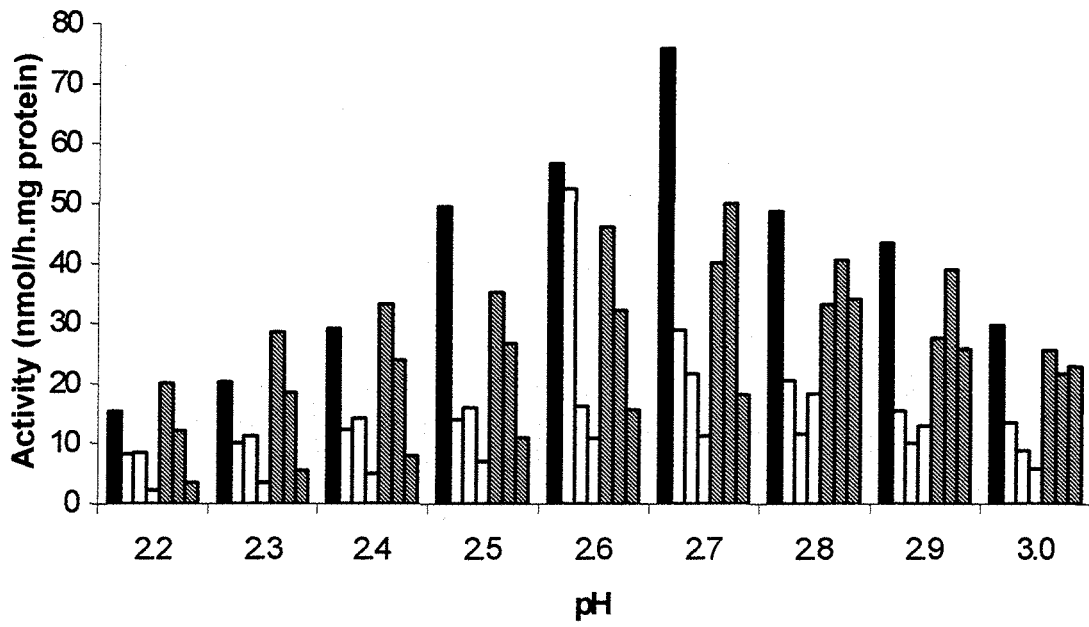


Figure 2

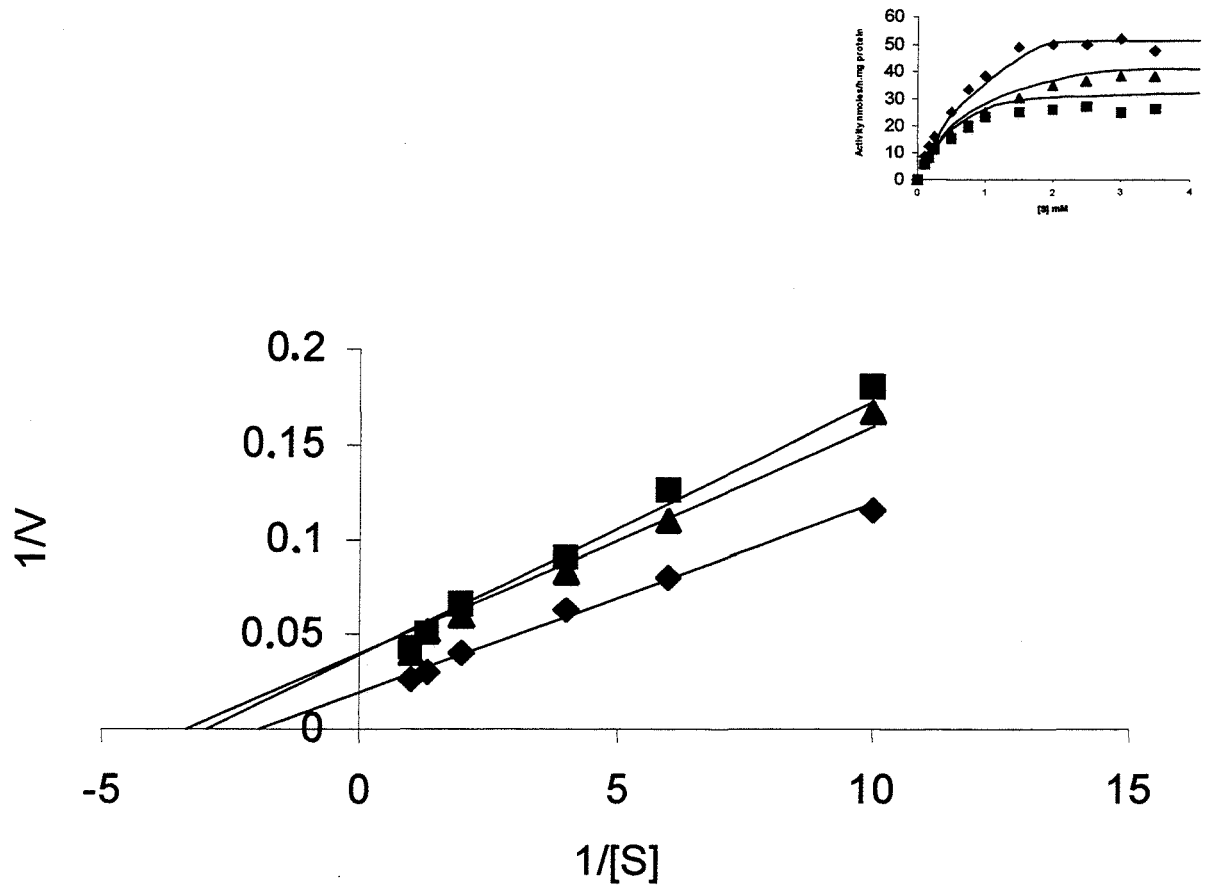
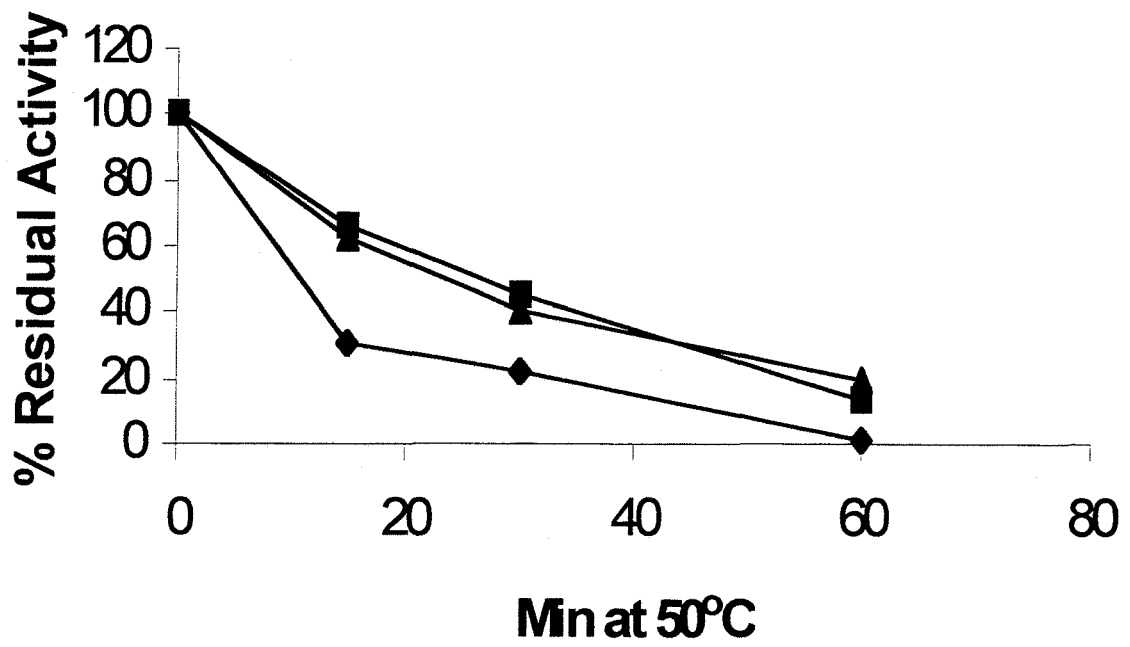


Figure 3



CAPÍTULO 2

Detection of Mucopolysaccharidosis type I heterozygotes on the basis of the biochemical properties of plasma α -L-iduronidase

Jovana Mandelli, Alessandro Wajner, Ricardo Pires, Roberto Giugliani and Janice
C. Coelho

Artigo aceito para publicação na Clinica Chimica Acta (2001)

**Detection of Mucopolysaccharidosis type I heterozygotes on the basis of the
biochemical properties of plasma α -L-iduronidase**

Jovana Mandelli^{a,c}, Alessandro Wajner^{a,c}, Ricardo Pires^c, Roberto Giugliani^{b,c} and
Janice C. Coelho^{a,c,*}

^a*Department of Biochemistry, ICBS, Federal University of Rio Grande do Sul,
Porto Alegre, RS, Brazil*

^b*Department of Genetics, IB, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto
Alegre, RS, Brazil*

^c*Service of Medical Genetics, University Hospital of Porto Alegre, Porto Alegre,
RS, Brasil*

Running head: Biochemical properties of plasma α -L-iduronidase

Correspondence: Dr Janice C. Coelho
Hospital de Clínicas de Porto Alegre
Serviço de Genética Médica
Rua Ramiro Barcelos, 2350
Porto Alegre – RS
90035-003
Brazil
Phone: + 55 51 3168011
Fax: +55 51 3168010
e-mail: jcoelho@hcpa.ufrgs.br

Abstract

Mucopolysaccharidosis type I (MPS I) is a disease caused by deficiency of the enzyme α -L-iduronidase (IDUA). Since no treatment is currently available for this disorder, the detection of heterozygotes is very important for genetic counseling and prenatal diagnosis. The objective of the present study was to characterize plasma IDUA from MPS I heterozygotes in an attempt to distinguish it from that of normal individuals. To this end, we determined the optimum pH, K_m , V_{max} and C_α (V_{max}/K_m) of the reaction and the thermal stability of IDUA at 50°C. The results show that MPS I heterozygotes can be separated from normal individuals on the basis of the K_m , C_α and thermal stability of the enzyme. Furthermore, taking into consideration the clinical status of the homozygous offspring, we subdivided the MPS I heterozygotes into various subgroups (Hurler, Scheie or Hurler/Scheie compound) and verified that the Hurler subgroup had a lower optimum pH for IDUA activity than controls and the other MPS I subgroups and that all MPS I subgroups had higher K_m and lower C_α when compared to controls.

1. Introduction

Hurler, Scheie and Hurler/Scheie syndromes (mucopolysaccharidoses types I H, S and H/S) are phenotypes associated with deficiency of the lysosome enzyme α -L-iduronidase (IDUA), a hydrolase necessary for the degradation of the glycosaminoglycans (GAGs) dermatan and heparan sulfate [1]. By being only partially degraded, the GAGs accumulate in the lysosomes, causing a progressive deterioration of cells, tissues and organs [1].

The three phenotypes differ in severity, with MPS IH being the most severe, MPS IS the mildest, and MPS I H/S presenting an intermediate phenotype. Since the enzyme deficiency, inherited in an autosomal recessive manner, is present in the 3 phenotypes, biochemical distinction based only on the determination of enzyme activity becomes difficult [1-4]. Clements et al [5] distinguished biochemically homozygotes with the mild form from homozygotes with the intermediate and severe forms and demonstrated that, even though the mutation is unknown, it is possible to predict the clinical phenotype based on certain biochemical properties of the enzyme in fibroblasts.

Most of the studies reported in the literature were carried out on fibroblasts obtained from a skin biopsy but it is known that IDUA activity can be measured in other materials such as urine, liver, leukocytes and plasma [6-8]. Among them, plasma is the most easily obtained and provides reproducible and rapid results with no need for cell culture [7].

The biochemical behavior of IDUA in heterozygotes has not been well established. Measuring the enzyme activity in most cases does not permit the

identification of a heterozygote since there is a marked overlap of the IDUA activity of these individuals with that of normal individuals [1]. The same occurs with many lysosomal hydrolases that are deficient in lysosomal depot diseases. Taking this into consideration, Sopelsa et al. [9] elaborated a protocol of biochemical characterization and applied it to heterozygotes for gangliosidosis GM1. These investigators observed that the enzyme beta-galactosidase of heterozygotes, although having activity which overlapped that of normal individuals, presented a different biochemical behavior that permitted its identification in a population at high risk for the disease.

The identification of heterozygotes by biochemical methods is still preferred, since in diseases such as MPS I, molecular identification is a difficult and time consuming task due to the highly polymorphic nature of the gene and to the fact that mutation analysis shall be carried out first in an index case. More than 50 different mutations have been identified so far [4], and 6 of them (Q70X, R89Q, A327P, R383H, W402X and P533R) have been already found among Brazilian patients [10].

The objective of the present investigation was to study some biochemical properties of IDUA in plasma from MPS I heterozygotes in order to identify those that would permit detection of these individuals especially in families at risk, contributing to the prevention of the disease through genetic counseling and prenatal diagnosis.

2. Material and methods

4-Methylumbelliferyl- α -L-iduronide was obtained from Sigma Chemical Co. and the other reagents from Merck.

2.1. Samples

Plasma samples were obtained from peripheral venous blood collected with heparin by centrifugation for 10 min at 2000 rpm and stored at -40°C until analysis. Samples from normal individuals were obtained from volunteer blood bank donors. Samples from 19 heterozygous individuals were obtained from the parents of patients with MPS I (H, S or H/S). The study was carried out in accordance with the Declaration of Helsinki of the World Medical Association and was approved by the Ethics Committee of Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Informed consent was obtained from all subjects who participated in this study.

2.2. Enzyme assays

Plasma enzyme activity was determined as described by Hopwood et al [11] using 4-methylumbelliferyl(4MU)- α -L-iduronide as substrate. The assay mixture contained 10 μL of 2 mM substrate, 10 μL of 0.1 M sodium formate and 10 μL of plasma and was incubated for 4 hours at 37°C . The reaction was stopped with 1.5 mL of 0.5 M glycine-sodium hydroxide buffer, pH 10.3, and fluorescence was read with a Hitachi F-2000 spectrofluorometer (excitation and emission wavelength of 365 and 450 nm, respectively). Unless otherwise stated, all assays were performed in duplicate.

For optimum pH determination we used 0.1 M sodium formate buffer with pH varying from 2.2 to 3.2. Determination of the optimum pH for IDUA activity was always performed five times for each sample analyzed and the median was chosen for the calculations.

For the determination of the Michaelis-Menten plot (substrate curve) we used final substrate concentrations of 0.1 to 3.5 mM. After linearity was determined, K_m and maximum velocity (V_{max}) were determined with substrate concentrations of 0.1 to 0.75 mM. The parameters were calculated using the Lineweaver and Burk [12] plot, with a correlation coefficient of $r = 0.99$ for all curves.

For the study of enzyme thermal stability, samples were pre-incubated at 50°C for 1, 3, 5, 12 and 24 hours. The reaction was then processed at 37°C for 4 hours with 2 mM substrate.

2.3. Statistical analysis

Data are reported as mean \pm SD. One-way ANOVA was used to compare groups, followed by the Tukey test when necessary. For comparison between controls and heterozygotes we used the Student *t*-test. The analysis was performed using the statistical software package SPSS/PC+ and the level of significance was set at $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Optimum pH determination

Figure 1 shows the optimum functioning pH for IDUA activity in normal individuals (controls) and the MPS I carriers studied, which were subdivided into three groups according to their homozygous offspring phenotype (Hurler, Scheie or Hurler/Scheie compound). In normal individuals, the mean optimum pH for IDUA activity was 2.68 ± 0.04 . In the heterozygous subjects, the mean optimum pH was 2.66 ± 0.087 , with no significant difference between controls and MPS I heterozygotes ($t = 0.689$, $p > 0.05$). However, heterozygotes having a Hurler homozygous offspring showed a significantly different optimum pH for IDUA activity compared to controls and to the other groups [$F(3,25) = 9.959$; $p < 0.0002$] (Fig. 1).

3.2. Km and Vmax determination

The Km of IDUA in plasma from normal individuals was 0.208 ± 0.043 mM, ranging from 0.17 to 0.29 mM. In heterozygous subjects, the Km ranged from 0.23 to 0.65 mM with a mean Km of 0.449 ± 0.129 mM. The latter result differed significantly from that obtained in controls ($t = 3.399$; $p < 0.01$). Furthermore, taking into consideration the offspring phenotype, the Km of all subgroups of heterozygotes (H, S and H/S) differed significantly from controls, but not between MPS I subgroups ($F(3,25)=12.00$, $p < 0.001$) (Fig. 1).

Our studies also demonstrated that the Vmax of IDUA in plasma from carrier individuals was 7.26 ± 2.86 nmol/h/mL, ranging from 2.72 to 12.33 nmol/h/mL. This result did not differ from that observed for the control group, i.e.,

8.89 ± 2.25 nmol/h/mL (ranging from 5.52 to 11.95 nmol/h/mL) ($t = 0.759$, $p > 0.05$) (Fig. 1). Furthermore, when we compared the V_{max} of the heterozygote subgroups and controls, we found that there was no significant difference [$F(3,25)=4.24$; $p > 0.05$] (Fig. 1).

A classical curve for K_m and V_{max} based on a Lineweaver and Burk (1934) plot can be seen in Fig. 2. This figure illustrates the K_m and V_{max} of controls and all heterozygotes taken together.

3.3. Cotangent of the alpha angle (C_α)

The cotangent of the alpha angle of the Lineweaver and Burk plot was calculated by dividing V_{max} by K_m . This value was 43.65 ± 11.9 for the control group and was significantly higher ($t = 5.97$; $p < 0.01$) than that for all heterozygotes together (18.28 ± 7.29). When we separated the heterozygotes into three subgroups, we observed that the C_α of the control group differed from all other subgroups but not between subgroups [$F(3,25) = 11.86$; $p < 0.001$] (Fig. 1).

3.4. Heat stability studies

For heat stability studies, plasma samples were pre-incubated at 50°C for 1, 3, 5, 12 or 24 hours before the addition of the substrate.

Fig. 3 compares residual IDUA activity in normal individuals (control group) and in the MPS I heterozygotes as a whole when samples were pre-incubated at 50°C for 1, 3, 5, 12 or 24 hours. It can be seen that in both groups IDUA activity was significantly and linearly reduced as pre-incubation time increased (controls: $F(6,29) = 693.5$; $p < 0.01$, $r=0.995$, $p < 0.05$; heterozygote:

$F(6,64) = 186.05$; $p < 0.001$, $r=0.998$, $p < 0.05$). Furthermore, IDUA activity in the heterozygote group was more stable at longer pre-incubation periods compared to controls (12 hours: $t = 4.41$; $p < 0.01$; 24 hours: $t = 7.95$, $p < 0.01$).

4. Discussion

Measurement of IDUA activity does not seem to be a good method for the detection of MPS I heterozygotes since the values obtained for these individuals most of the time overlap with those of normal individuals. Thus, new forms of heterozygote detection should be sought for genetic counseling and prenatal diagnosis since, thus far, there is no effective treatment for this severe metabolic disease, with carrier detection being the service most frequently requested by the families of affected patients [1]. The detection of heterozygotes by molecular analysis is a difficult and time-consuming method since more than 50 different mutations have been described thus far [4], 6 of them having been detected in Brazilian individuals [10].

This information led us to think about another alternative for the detection of MPS I heterozygotes in a high-risk population, and an adequate tool for this seemed to be the detection of heterozygotes on the basis of the biochemical properties of IDUA.

Some studies carried out on fibroblasts demonstrated that the IDUA of normal individuals has biochemical characteristics differing from those of the enzymes of MPS I homozygotes and that the characteristics of the enzyme of affected individuals are correlated with the genotype and clinical course of this disease [5,13,14,15].

In the present study, plasma IDUA from MPS I obligate heterozygotes was characterized for the first time. These individuals were the parents of patients with a diagnosis of MPS I (Hurler, Scheie or Hurler/Scheie).

In a first step, we assigned all heterozygotes to the same group and compared the biochemical properties of their IDUA with those of IDUA from normal individuals. We observed that the IDUA of heterozygotes behaved in a different manner when compared to that of normal individuals, especially in terms of K_m , C_α and thermal stability. In addition, MPS I heterozygotes did not differ from controls in terms of optimum pH for IDUA activity and V_{max} .

Next, we subdivided the MPS I carriers into three subgroups according to their offspring phenotype. By analyzing the biochemical data of the enzyme in these subgroups, we observed that the optimum pH for the enzyme activity in the Hurler subgroup was significantly lower than that of normal individuals and the other MPS I subgroups. Although the difference in mean optimum pH between the Hurler subgroup and controls was relatively small, the experiments were carefully conducted with five reproducible determinations performed for each plasma sample. Although further analysis should be carried out to confirm these findings, the difference detected seems to be real.

As regards K_m and C_α properties, all heterozygote subgroups were significantly different from normal individuals, thus permitting their differentiation in a high-risk population as a group, as mentioned above, or as heterozygotes for Hurler, Scheie or Hurler/Scheie compound subgroups.

We also observed that the IDUA of normal individuals was more thermolabile than that of heterozygotes, particularly at long pre-incubation periods

at 50°C. After 12 and 24 hours of preincubation at 50°C, the enzyme of all heterozygotes considered together behaved in a significantly different manner compared to normal individuals, thus permitting their distinction. Therefore, the study of enzyme thermolability also yielded results compatible with those obtained by analysis of K_m and C_α , i.e., this parameter was useful for the identification of MPS I heterozygotes.

We must also emphasize that the biochemical properties investigated in each MPS I subgroup varied widely (results not shown). We assume that this heterogeneity is probably related to the distinct mutations carried by these individuals.

In this context, our results are in agreement with Le-Chen et al. [16] who demonstrated a large number of mutations in the IDUA gene known for Hurler, Scheie and Hurler/Scheie syndromes. These investigators also showed that there are a variety of specific mutations for each case which can cause a reduction in enzymatic activity leading to non-reduction of IDUA mRNA or even a reduction in the concentration, function or viability of IDUA [3]. Unfortunately, we were not able to perform mutational analysis in our sample.

Therefore, the best parameters for distinguishing heterozygotes from normal individuals were K_m , C_α , and the thermal stability of the enzyme at 50°C for longer periods of incubation.

In conclusion, on the basis of all five parameters analyzed, i.e., optimum pH, K_m , V_{max} , C_α and thermostability of IDUA at 50°C pre-incubation, we verified that the enzyme of heterozygotes for MPS I Hurler, Scheie and Hurler-Scheie syndromes behaves differently from the enzyme of normal individuals in at

least three of these parameters, K_m , C_α and thermostability. Furthermore, a wide biochemical heterogeneity of the biochemical parameters analyzed could be observed within the MPS I heterozygote group which was probably secondary to distinct mutations leading to a variety of the mode of expression of the enzyme. These findings may be of help to distinguish heterozygotes for MPS 1 from normal individuals in a high-risk population.

Acknowledgements

This study was supported by CNPq, FINEP/HCPA and PRONEX-MCT (Brazilian Research Agencies). The authors are indebted to Prof. Moacir Wajner for the critical review of the paper and valuable suggestions.

List of abbreviations

MPS I: Mucopolysaccharidosis Type I

H: Hurler syndrome

S: Scheie syndrome

H/S: Hurler/Scheie syndrome

IDUA: α -L-iduronidase

GAGs: Glycosaminoglicans

V_{max}: Maximum Velocity

C α : cotangent of the alpha angle

References

- [1]. Neufeld EF, Muenzer J. The Mucopolysaccharidoses. In Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease*. 7th edn. Pp. 2465-24941. New York: McGraw-Hill, 1995.
- [2]. Hopwood JJ and Morris CP. The mucopolysaccharidoses: diagnosis, molecular genetics and treatment. *Mol Biol Med* 1990; 7:381-404.
- [3]. Ashton LJ, Brooks DA, McCourt PAG, Muller VJ, Clements PR and Hopwood JJ. Immunoquantification and enzyme kinetics of α -L-iduronidase in cultured fibroblasts from normal controls and mucopolysaccharidosis type I patients. *Am J Hum Genet* 1992; 50:787-794.
- [4]. Scott HS, Bunge S, Gal A, Clarke LA, Morris CP, Hopwood JJ. Molecular genetics of mucopolysaccharidosis type I: diagnostic, clinical and biological implications. *Hum Mutat* 1995; 6:288-302.
- [5]. Clements PR, Yogalingam G, Brooks DA, Muller VJ and Hopwood JJ. α -L-iduronidase genotype/protein function relationships in MPS I fibroblasts *J Inher Metab Dis* 2000; 23:237.
- [6]. Matalon R and Dorfman A. Hurler's syndrome, and α -L-iduronidase deficiency. *Biochem Biophys Res Commun* 1972; 47: 959-964.
- [7]. Singh J, Niebes P and DiFerrante N. A method for α -L-iduronidase assay. *FEBS Lett* 1974; 45:248-251.
- [8]. Dulaney JT, Milunski A and Moser HW. Detection of the carrier state of Hurler's syndrome by assay of α -L-iduronidase in leukocytes. *Clin Chim Acta* 1976; 69:305-310.
- [9] Sopelsa AMI, Severini MHA, Silva, CMD, Tobo PR, Giugliani R and Coelho JC. Characterization of β -galactosidase in leukocytes and fibroblasts of GM1 gangliosidosis heterozygotes compared to normal subjects. *Clin Biochem* 1999; 33:125-130.

- [10]. Matte U, Leistner S, Lima L, Schwartz I, Giugliani R. Unique frequency of known mutations in Brazilian MPS I patients. *A.m. J. Hum Genet* 2000; 90:108-109.
- [11]. Hopwood JJ, Muller V, Smithson A and Baggett N. A fluorometric assay using 4-methylumbelliferyl- α -L-iduronide for the estimation of α -L-iduronidase activity and the detection of Hurler and Scheie syndromes. *Clin Chim Acta* 1979; 92:257-265.
- [12]. Lineweaver H and Burk D. The determination of enzyme dissociation constants. *J Am Chem Soc* 1934; 56:658-666.
- [13]. Fujibayashi S, Minami R, Ishikawa Y, Wagatsuma K, Nakao T and Tsugawa S. Properties of α -L-iduronidase in cultured skin fibroblasts from α -L-iduronidase-deficient patients. *Human Genet* 1984; 65:268-272.
- [14]. Hopwood JJ and Muller V. Biochemical discrimination of Hurler and Scheie syndromes. *Clin Sci* 1979; 57:265-272.
- [15]. Bunge S, Clements PR, Byers S, Kleijer WJ, Brooks DA and Hopwood JJ. Genotype-phenotype correlations in mucopolysaccharidosis type I using enzyme kinetics, immunoquantification and in vitro turnover studies. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1407:249-256.
- [16]. Lee-Chen GJ, Lin SP, Tang YF and Chin YW. Mucopolysaccharidosis type I: characterization of novel mutations affecting α -L-iduronidase activity. *Clin Genet* 1999; 56:66-70.

Figure Legends

Fig. 1. Biochemical properties of α -L-iduronidase activity in plasma from normal individuals and MPS I heterozygotes. MPS I heterozygotes were subdivided into various subgroups according to their homozygous offspring. C = controls (n = 7), H = Hurler (n = 8), S = Scheie (n = 5), H/S = Hurler/Scheie (n = 6). * p < 0.05 statistically different from controls (one-way ANOVA).

Fig. 2. Lineweaver and Burk plot for α -L-iduronidase in plasma samples from normal individuals and MPS I heterozygotes. S = substrate; v = velocity. Controls (◆, n = 7); heterozygotes (■, n = 19)

Fig. 3. Thermal stability of α -L-iduronidase activity in plasma samples from normal individuals and from MPS I heterozygotes. Enzyme activity is reported as percentage of residual activity compared to samples not submitted to pre-incubation (100% activity). ■ Normal individuals (n = 7); ▨ heterozygotes (n = 19); ** p < 0.01 statistically different from controls (Student's t-test).

Figure 1

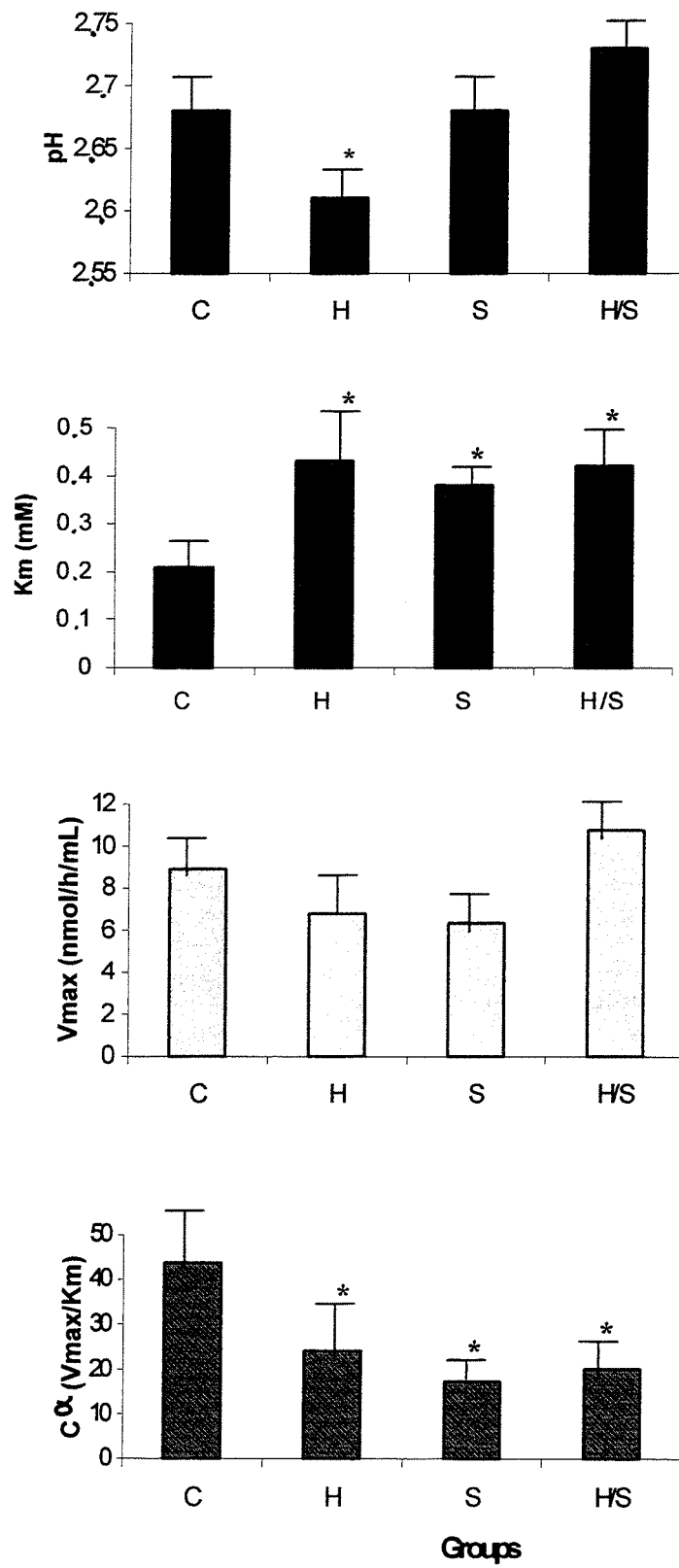


Figure 2

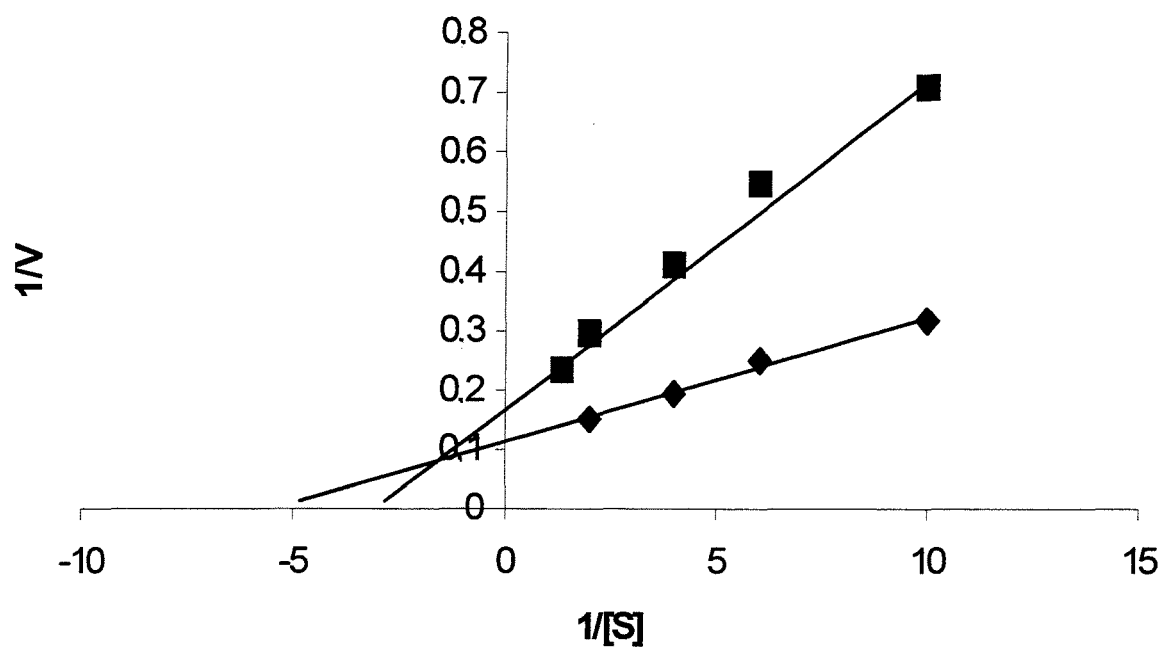
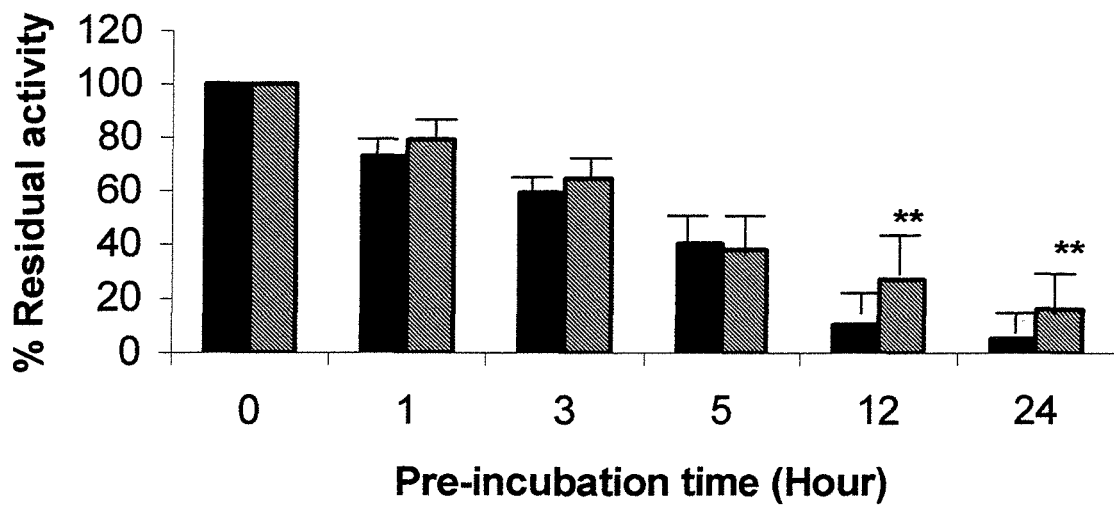


Figure 3



CAPÍTULO 3

**Effect of CuCl₂, NaCl and EDTA on the enzyme α -L-iduronidase in the
plasma of normal individuals and heterozygotes for MPS I**

Jovana Mandelli, Alessandro Wajner, Ricardo Pires, Roberto Giugliani and Janice
C. Coelho

Artigo submetido para publicação na Clinica Chimica Acta (2001)

Effect of CuCl_2 , NaCl and EDTA on the enzyme α -L-iduronidase in the plasma of normal individuals and heterozygotes for MPS I

Jovana Mandelli^{a,c}, Alessandro Wajner^{a,c}, Ricardo Pires^c, Roberto Giugliani^{b,c} and Janice C. Coelho^{a,c,*}

Running head: Effect of NaCl, CuCl_2 and EDTA on plasma α -L-iduronidase

^a*Department of Biochemistry, ICBS, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil*

^b*Department of Genetics, IB, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil*

^c*Service of Medical Genetics, University Hospital of Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brasil*

Correspondence to: Janice C. Coelho, PhD
Serviço de Genética Médica
Hospital de Clínicas de Porto Alegre
Rua Ramiro Barcelos, 2350 sala 2243
90035-003 – Porto Alegre – RS
Brazil
fone: + 55 51 3168011
fax: + 55 51 33168010 or 33165535
e-mail: jcoelho@hcpa.ufrgs.br

Abstract

It has been previously demonstrated that the enzyme α -L-iduronidase (IDUA) of patients with MPS I shows a different biochemical behavior in each of the three clinical forms of these. In heterozygotes, its biochemical behavior has been recently established in leukocyte and plasma samples, demonstrating that it is possible to distinguish individuals heterozygous for MPS I within an unselected population. In the present study we evaluated the effect of copper chloride, EDTA and sodium chloride on the activity of the enzyme α -L-iduronidase in the plasma of normal individuals and of MPS I heterozygotes and observed the type of inhibition caused, the K_i , the apparent K_m and the apparent V_{max} for each inhibitor. NaCl inhibited the enzyme in normal individuals and in 40% of the heterozygotes evaluated and activated it in 60% of heterozygotes. The remaining compounds inhibited IDUA in both heterozygotes and normal individuals. We detected significant differences capable of differentiating MPS I heterozygotes from normal individuals by simply adding sodium chloride, EDTA or copper chloride to the incubation medium at the time of IDUA activity determination, with a potential use in carrier detection protocols.

Key-words: mucopolysaccharidosis, alpha-iduronidase, heterozygotes

1. Introduction

Type I mucopolysaccharidosis (MPS I), McKusick 25280 is a metabolic disorder inherited in a recessive autosomal mode. This disease is caused by deficiency of the lysosomal hydrolase α -L-iduronidase (IDUA, E.C.3.2.1.76), that degrades the glycosaminoglycans (GAGs) dermatan and heparan sulfate [1,2]. By being only partially degraded, the GAGs are partially eliminated in the urine and accumulate in the lysosomes, causing a progressive deterioration of cells, tissues and organs [1,2].

There are three clinical forms of MPS I: Hurler syndrome (MPS IH), the most severe, Scheie syndrome (MPS IS), the mildest, and Hurler/Scheie syndrome (MPS IH/S), the intermediate one [1]. The diagnosis of MPS I is made by the measurement of IDUA activity, which is markedly deficient in all cases [2,3].

Biochemical differences in the IDUA of the three clinical phenotypes have been previously observed, permitting the distinction between these phenotypes [4-7]. Particularly, Clements et al. [4] demonstrated that, based on certain biochemical properties of fibroblast IDUA, it is possible to predict the clinical phenotype of a patient even with no knowledge about the mutation involved.

The gene coding for IDUA is mapped in the 4p16.3 region, 600 kb from the telomere [8]. By the year 2001, fifty different pathogenic mutations had been detected in the IDUA gene [9]. Among the 10 most frequent pathogenic mutations, six were identified in Brazilian patients [10]. Nevertheless, molecular identification of carriers is a difficult and time consuming task since the gene is highly

polymorphic and mutation analysis must be carried out first in an index case. Thus, identification of heterozygotes by biochemical methods would be an useful tool for studies in families and populations.

Since these diseases cannot be effectively treated, the identification of heterozygotes is a good choice for persons who have one affected child in their families. According to Neufeldt and Muenzer [2], heterozygote detection is the service most often requested by families of affected patients. On the other hand, heterozygotes for lysosomal diseases can have intermediate levels of enzyme activity between normal and affected individuals, although the activity ranges may overlap [2]. This impairs full detection of heterozygotes in some cases and other methods should be considered, such as the observation of the biochemical behaviour of IDUA.

The detection of heterozygotes by biochemical methods is already being performed in lysosomal diseases [11]. In previous works [12,13] we described biochemical differences in leukocytes and plasma samples from MPS I heterozygotes that were capable to distinguish these patients from normal individuals, permitting their detection in high risk populations.

Several investigators have studied the effect of ions on precursor and mature forms of IDUA and on IDUA activity in MPS I patients [6, 14-17], but there are no reports on the response of IDUA from MPS I heterozygotes to these compounds.

In the present study we observed the effect of copper chloride, EDTA and sodium chloride on plasma IDUA from MPS I heterozygotes and compared it

to the effect on IDUA from normal individuals, in order to develop a biochemical method for the detection of MPS I carriers.

2. Materials and Methods

2.1. Chemicals

4-Methylumbelliferyl (4MU)- α -L-iduronide was obtained from Sigma and other reagents were purchased from Merck.

2.2 Samples

Plasma samples were obtained from peripheral venous blood collected with heparin by centrifugation for 10 min at 2000 rpm and stored at -40°C until analysis. Samples from normal individuals were obtained from volunteer blood bank donors. Samples from 20 heterozygous individuals were obtained from the parents of patients with MPS I (H, S or H/S). This research was carried out in accordance with the Declaration of Helsinki of the World Medical Association and was approved by the Ethics Committee of Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Informed consent was obtained from all subjects who participated in this study.

2.3. Enzyme Assays

Plasma enzyme activity was determined as described by Hopwood et al. [18] using 4-methylumbelliferyl (4MU)- α -L-iduronide as substrate. The assay mixture contained 10 μL of 2 mM substrate, 10 μL of 0.1 M sodium formate and 10 μL of plasma and was incubated for 4 hours at 37°C . The reaction was stopped with 1.5 mL of 0.5 M glycine-sodium hydroxide buffer, pH 10.3, and fluorescence was read with a Hitachi F-2000 spectrofluorometer (excitation and emission wavelength of 365 and 450 nm, respectively). Copper chloride (10 mM), EDTA (20

mM) and sodium chloride (100mM) were added to the incubation medium in the presence of the enzyme.

For the determination of the Michaelis-Menten plot (substrate curve) we used final substrate concentrations of 0.1 to 3.5 mM. After linearity was determined, K_m was determined using substrate concentrations of 0.1 to 0.75 mM. These results were calculated using the Lineweaver and Burk [19] plot, with a correlation coefficient of $r = 0.99$ for all curves.

The K_i values (inhibition constant) were determined from a Dixon plot.

All experiments were repeated at least three times and similar results were obtained.

2.4. Statistical analysis

Data are reported as mean \pm SD. For comparisons among groups we used one-way ANOVA and for comparisons between two groups we used the Student t test. The analysis was performed using the statistical software package SPSS/PC+, version 3.0, and the level of significance was set at $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Effect of sodium chloride on IDUA activity

In plasma from normal individuals, the enzyme activity was $79.7 \pm 10.3\%$ at a concentration of 100 mM NaCl (Figure 1) in relation to control enzyme activity (no NaCl added = 100%). This inhibition of 20.3% was statistically significant ($t = 5.55$, $p < 0.01$). The K_m in the presence of the inhibitor (Table 1), apparent K_m , was 0.81 mM and was significantly higher than the K_m of the enzyme (0.22 mM) in the absence of NaCl ($t = 12.91$, $p < 0.01$). The V_{max} of the reactions was the same in both conditions, i.e. with or without inhibitor (Table 1). These results indicate a competitive inhibition of IDUA from normal individuals by NaCl. The K_i value obtained was 183 ± 59.0 mM.

When we added NaCl to the incubation medium containing IDUA from MPS I carriers, two different kinetic behaviors of this enzyme were observed (Figure 1). In 40% of the heterozygotes studied (group 1), IDUA was competitively inhibited by NaCl and its activity was $74.7 \pm 10.2\%$ in relation to enzyme activity in the absence of the inhibitor (100%). The inhibition of 25.3% was statistically significant ($t = 7.43$, $p < 0.01$). Its K_m was 0.48 mM, significantly lower (1.3 times, $t = 4.88$, $p < 0.01$) than the K_m for the enzyme without the inhibitor (0.37 mM) and its V_{max} was the same as that obtained in the absence of the inhibitor (Table 1). The K_i value for this group was 244.0 ± 80.9 mM.

In the other group of carriers (group 2 – Figure 1), the enzyme was significantly activated (21.3%) by NaCl ($t = 6.36$, $p < 0.01$). In this group, the

apparent K_m was 0.53 mM and V_{max} was 13.15 nmol/h/mL (Table 1).

When the apparent K_m for the normal enzyme in the presence of NaCl was compared with the apparent K_m from heterozygote samples that suffered inhibition (group 1), the values were significantly different ($t = 4.63$, $p < 0.01$). The same occurred with K_i values, with the K_i for the normal enzyme being lower than the K_i for group 1 IDUA ($t = 2.56$; $p < 0.05$).

For the two studies described below, heterozygotes were divided into groups 1 and 2 according to IDUA response to NaCl added to the incubation medium.

3.2. Effect of EDTA on IDUA activity

EDTA was a competitive inhibitor of plasma IDUA from normal individuals and MPS I carriers, as shown by the significant changes in K_m values, while V_{max} remained the same (Table 1). The normal enzyme lost a significant amount ($48.9 \pm 5.50\%$) of its activity ($t = 26.24$; $p < 0.01$) in the presence of EDTA (Figure 1). Table 1 shows that, in the presence of EDTA, the apparent enzyme K_m (0.48 mM) was significantly different ($t = 5.22$, $p < 0.01$) from the K_m in the absence of the inhibitor (0.22 mM) and V_{max} remained the same. The K_i was 13.65 ± 3.24 mM.

After four hours of incubation with the inhibitor (Figure 1), the IDUA of group 1 lost a significant amount ($42.64 \pm 5.40\%$) of its activity ($t = 31.86$, $p < 0.01$) and the IDUA of group 2 lost $54.78 \pm 7.89\%$ of its activity ($t = 20.66$, $p < 0.01$).

The K_m value of IDUA for group 1, in the absence of the inhibitor, was 0.37 mM (Table 1). When EDTA was added to the incubation medium, the K_m increased significantly to 0.67 mM ($t = 7.00$, $p < 0.01$). The same occurred with the enzyme of group 2, with K_m increasing significantly from 0.42 mM to 0.75 mM ($t = 4.38$, $p < 0.01$). In the presence of EDTA, these values were significantly different from the apparent K_m value for the normal enzyme [$F(2;30) = 11.27$; $p < 0.01$].

The apparent K_m of IDUA changed in the two groups of heterozygotes from 7.54 to 6.40 nmol/h/mL for group 1 and from 9.55 to 8.70 nmol/h/mL for group 2 and was similar to that of the control group in the presence of EDTA (8.11 nmol/h/mL), but the V_{max} remained the same (Table 1).

The K_i for the two groups (group 1 = 13.90 ± 1.70 mM and group 2 = 15.39 ± 2.52 mM) did not differ from the K_i for normal IDUA (13.65 ± 3.24).

3.3. Effect of $CuCl_2$ on IDUA activity

Figure 1 shows that $CuCl_2$ was a strong inhibitor of IDUA activity. After 4 hours of incubation at $37^\circ C$ in the presence of the inhibitor, IDUA lost more than 90% of its activity in all groups of individuals, as follows: $95.7 \pm 1.32\%$ (controls), $96.7 \pm 1.74\%$ (group 1) and $96.3 \pm 1.95\%$ (group 2). These inhibitions were statistically significant when compared with samples not submitted to denaturation (controls: $t = 161.45$, $p < 0.01$; group 1: $t = 166.97$, $p < 0.01$ and group 2; $t = 163.86$, $p < 0.01$). In all groups, the inhibition caused by $CuCl_2$ was noncompetitive because the K_m value remained the same and the V_{max} was altered in the presence of the inhibitor (Table 1).

In normal individuals, IDUA had a K_m of 0.22 mM in the absence of the inhibitor, and a K_m of 0.21 mM in the presence of CuCl_2 (Table 1). The V_{max} of the reaction was 9.76 nmol/h/mL in the absence of the inhibitor and decreased to 0.23 nmol/h/mL when CuCl_2 was added ($t = 8.40$, $p < 0.01$). The K_i for CuCl_2 was 0.45 ± 0.13 mM.

Table 1 lists the results for the two heterozygote groups. The K_m of the reaction in the presence of the inhibitor was 0.38 mM in group 1, and 0.41 mM in group 2, with no difference from the K_m value observed without the inhibitor (group 1 = 0.37 mM and group 2 = 0.42 mM). In group 1 heterozygotes, V_{max} changed significantly from 7.54 nmol/h/mL in the absence of CuCl_2 to 0.26 nmol/h/mL in the presence of CuCl_2 ($t = 18.30$, $p < 0.01$) and in group 2 it changed from 9.55 nmol/h/mL to 0.37 nmol/h/mL ($t = 7.44$, $p < 0.01$) (Table 1).

When the K_m obtained for the IDUA from normal individuals in the presence of the inhibitor was compared with the K_m for the two groups of carriers, this parameter was found to be higher in both heterozygote groups than in controls [$F(2;27)=7.81$; $p < 0.01$], whereas the V_{max} of the two heterozygote groups in the presence of the inhibitor did not differ significantly from that of the enzyme of the control group.

The K_i values for the heterozygote groups were similar, i.e. 0.33 ± 0.17 mM for group 1 and 0.40 ± 0.20 mM for group 2, and did not differ from the K_i of IDUA from normal individuals.

4. Discussion

The detection of heterozygotes is an important procedure for the prevention of the birth of affected individuals in families at risk for MPS I [2]. MPS I is a serious inborn error of metabolism and the therapeutic measures available only improve the life conditions of the patient but do not prevent the progression of the clinical manifestations which, in the most severe form (MPS IH), lead to death usually in the first decade.

Measurement of the activity of the deficient enzyme is routinely used in the detection of heterozygotes for deposit lysosomal diseases, as the activity of these patients is usually about half that of normal individuals. However, this determination is not reliable as in many heterozygotes the activity of the enzyme overlaps that of normal individuals, greatly impairing carrier identification [2].

The use of molecular biology techniques for the diagnosis of hereditary diseases has been intensively debated over the last decade, but the detection of heterozygotes by molecular analysis is a difficult and time-consuming method since more than 50 different mutations have been described thus far [3] and the mutation of the index case should be previously known, a fact that frequently is not possible.

We have recently demonstrated that IDUA in leukocytes [12] and plasma [13] of MPS I heterozygotes shows a different biochemical behavior compared to normal individuals. These biochemical differences seem to be able to identify MPS I heterozygotes in a population at high risk for this disease. These findings led us to study other biochemical characteristics of IDUA in these two groups of individuals, such as the response of the enzyme to compounds like NaCl, CuCl₂ and EDTA added to the incubation medium.

Clements et al. [16] studied the effect of sodium chloride on liver IDUA in normal individuals and observed that this salt at the concentration of 150 mM is an inhibitor of the competitive type, with an apparent K_m of 0.91 mM and a K_i of 192 mM. Our results show that plasma IDUA of normal individuals presented an apparent K_m of 0.81 mM and a K_i of 183 mM in the presence of 100 mM NaCl. We also observed, in agreement with the cited investigators, an increase in the apparent K_m of the enzyme when NaCl was added to the reaction, a fact confirming that this was an inhibition of the competitive type.

In the presence of NaCl, the enzyme of MPS I heterozygotes showed two different behaviors. In one heterozygote group, IDUA activity was significantly reduced in the presence of this salt, with inhibition similar to that observed in the control group. In the other group, the enzyme was activated by the salt. In either case, it was possible to distinguish the heterozygotes from normal individuals

Unger et al. [14] observed that the precursor form of IDUA showed increased activity in the presence of NaCl, whereas the opposite was observed for mature IDUA, with NaCl acting as an inhibitor. Perhaps the heterozygotes whose enzyme activity was increased in the presence of NaCl have mutations in the IDUA gene that may give origin to an enzyme behaving like the immature form, activated by the salt. This fact probably does not occur in normal individuals or in other heterozygotes possibly carrying mutations differing from those of the first group.

The separation of the sample of MPS I heterozygotes into two groups according to response to NaCl was used in the other two studies, in which,

however, we did not observe differences between group 1 and group 2 heterozygotes in terms of their responses to EDTA and CuCl_2 .

When EDTA was added to the incubation medium containing plasma IDUA from MPS I heterozygotes or normal individuals, the compound was found to act as an enzyme inhibitor at the concentration of 20 mM. This had also been previously observed by Den Tandt and Scharpe [15] in plasma of normal individuals, although these investigators demonstrated that EDTA reduced IDUA activity by about 20%. In addition, we demonstrated here that EDTA acted as a competitive inhibitor and that IDUA showed a higher apparent K_m in heterozygotes than in normal individuals, permitting the identification of heterozygotes in a population at high risk for MPS I.

Of the inhibitors used in the present study, copper chloride was the most potent. This result agrees with reports by Rome et al. [17] and Den Tandt and Scharpe [15]. Rome et al. [17] observed that kidney IDUA from normal individuals was fully inhibited by CuCl_2 and Den Tandt and Scharpe [15] demonstrated that, in the presence of EDTA, plasma IDUA from these individuals showed only 5% of its original activity (in the absence of the inhibitor). The 0.45 mM K_i observed in the present study for the normal enzyme in the presence of CuCl_2 , 0.45 mM, was closely similar to that observed by Clements et al. [16] for normal human liver IDUA (0.5 mM).

CuCl_2 proved to be a noncompetitive inhibitor, with the K_m of IDUA from MPS I heterozygotes increasing significantly compared to the K_m of the enzyme from normal individuals. This study also served to distinguish heterozygotes from unaffected individuals.

The MPS I heterozygotes analyzed in this study had unidentified mutations, so that the sample investigated may have been genetically heterogeneous and the results obtained may not be applied to all carriers. Further studies are needed in this respect.

As to offspring phenotype, we know that of the 8 heterozygotes belonging to group 1, 2 had MPS I Scheie children, 2 MPS I Hurler/Scheie children, and 4 MPS I Hurler children. In group 2 there were 3 fathers or mothers of Scheie individuals, 4 fathers or mothers of Hurler/Scheie individuals, and 5 had MPS I Hurler children.

In conclusion, the present study demonstrated that it is possible to identify MPS I heterozygotes in a high risk population simply by adding sodium chloride, EDTA or copper chloride to the incubation medium at the time of determination of IDUA activity. These data support those obtained in studies of leukocyte and plasma IDUA from normal individuals and from MPS I heterozygotes [12, 13], which had previously demonstrated that heterozygotes can be detected on the basis of the biochemical parameters of the enzyme.

Aknowledgements

This study was supported by CNPq, GPPG/HCPA and PRONEX-MCT (Brazilian Research Agencies).

List of abbreviations

MPS I: Mucopolysaccharidosis type I

H: Hurler syndrome

S: Scheie syndrome

H/S: Hurler/Scheie syndrome

IDUA: α -L-iduronidase

GAGs: Glycosaminoglicans

Vmax: Maximum Velocity

References

- [1]. Gilbeert – Barness E and Barness L. *Metabolic Diseases*. Vol 1. Pp. 249-262. Eaton Publishing Natick, 2000.
- [2]. Neufeld EF, Muenzer J. The Mucopolysaccharidoses. In Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. 8th edn. Pp. 3421-3442. New York: McGraw-Hill, 2001.
- [3]. Scott HS, Bunge S, Gal A, Clarke LA, Morris CP, Hopwood JJ. Molecular genetics of mucopolysaccharidosis type I: diagnostic, clinical and biological implications. *Hum Mutat* 1995; 6:288-302.
- [4]. Clements PR, Yogalingam G, Brooks DA, Muller VJ and Hopwood JJ. α -L-iduronidase genotype/protein function relationships in MPS I fibroblasts *J Inher Metab Dis* 2000; 23:237.
- [5]. Fujibayashi S, Minami R, Ishikawa Y, Wagatsuma K, Nakao T and Tsugawa S. Properties of α -L-iduronidase in cultured skin fibroblasts from α -L-iduronidase-deficient patients. *Human Genet* 1984; 65:268-272.
- [6]. Hopwood JJ and Muller V. Biochemical discrimination of Hurler and Scheie syndromes. *Clin Sci* 1979; 57:265-272.
- [7]. Bunge S, Clements PR, Byers S, Kleijer WJ, Brooks DA and Hopwood JJ. Genotype-phenotype correlations in mucopolysaccharidosis type I using enzyme kinetics, immunoquantification and in vitro turnover studies. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1407:249-256.
- [8]. Scott HS, Ashton LJ, Eyre HJ, Baker E, Brooks DA, Callen DF, Shuterland GR, Morris CP. Chromosomal localization of the human α -L-iduronidase gene (IDUA) to 4p 16.3. *Am J Hum Genet* 1990; 47:802-807.
- [9]. HGMD – The human gene mutation database Cardiff – <http://archive.uwcm.ac.uk>. 2001

- [10]. Matte U, Leistner S, Lima L, Schwartz I, Giugliani R. Unique frequency of known mutations in Brazilian MPS I patients. *Am J Hum Genet* 2000; 90:108-109.
- [11]. Sopelsa AMI, Severini MHA, Silva, CMD, Tobo PR, Giugliani R and Coelho JC. Characterization of β -galactosidase in leukocytes and fibroblasts of GM1 gangliosidosis heterozygotes compared to normal subjects. *Clin Biochem* 1999; 33:125-130.
- [12]. Mandelli J, Wajner A, Pires RF, Giugliani R and Coelho JC. Detection of Mucopolysaccharidosis Type I Heterozygotes Based on the Biochemical Characteristics of Leucocyte α -L-iduronidase. *Arch Med Res* 2001; *in press*.
- [13]. Mandelli J, Wajner A, Pires RF, Giugliani R and Coelho JC. Detection of Mucopolysaccharidosis type I heterozygotes on the basis of the biochemical properties of plasma α -L-iduronidase. *Clin Chim Acta* 2001; *in press*.
- [14]. Unger EG, Durrant J, Anson DS and Hopwood JJ. Recombinant α -L-iduronidase: characterization of the purified enzyme and correction of mucopolysaccharidosis type I fibroblasts. *Biochem J* 1994; 304:43-49.
- [15]. Den Tand WR, Scharpe S. Characteristics of leukocyte and plasma methylumbelliferyl- α -L-iduronide iduronidase. *Biochem Med Metab Biol* 1989; 41: 18-24.
- [16]. Clements PR, Muller V and Hopwood JJ. Human α -L-iduronidase 2. Catalytic properties. *Eur J Biochem* 1995; 152:29-34.
- [17]. Rome LH, Garvin AJ and Neufeld EF. Human kidney α -L-iduronidase: purification and characterization. *Arch Biochem Biophys* 1978; 189:344-353.
- [18]. Hopwood JJ, Muller V, Smithson A and Baggett N. A fluorometric assay using 4-methylumbelliferyl- α -L-iduronide for the estimation of α -L-iduronidase activity and the detection of Hurler and Scheie syndromes. *Clin Chim Acta* 1979; 92:257-265.
- [19]. Lineweaver H and Burk D. The determination of enzyme dissociation constants. *J Am Chem Soc* 1934; 56:658-666.

Figure Legend





Fig. 1. Effect of 100 mM NaCl, 20 mM EDTA and 10 mM CuCl₂ on plasma IDUA activity from normal individuals and MPS I heterozygotes. Enzyme activity is reported as percentage of residual activity in the presence of these compounds compared to IDUA activity in an incubation medium without inhibitor or activator (100% - ). Normal individuals  (n = 7); group 1 heterozygotes  (n = 8) and group 2 heterozygotes  (n = 12); ** p < 0.01 significantly different from IDUA activity measured without NaCl, EDTA or CuCl₂ added to the incubation medium.

Table 1

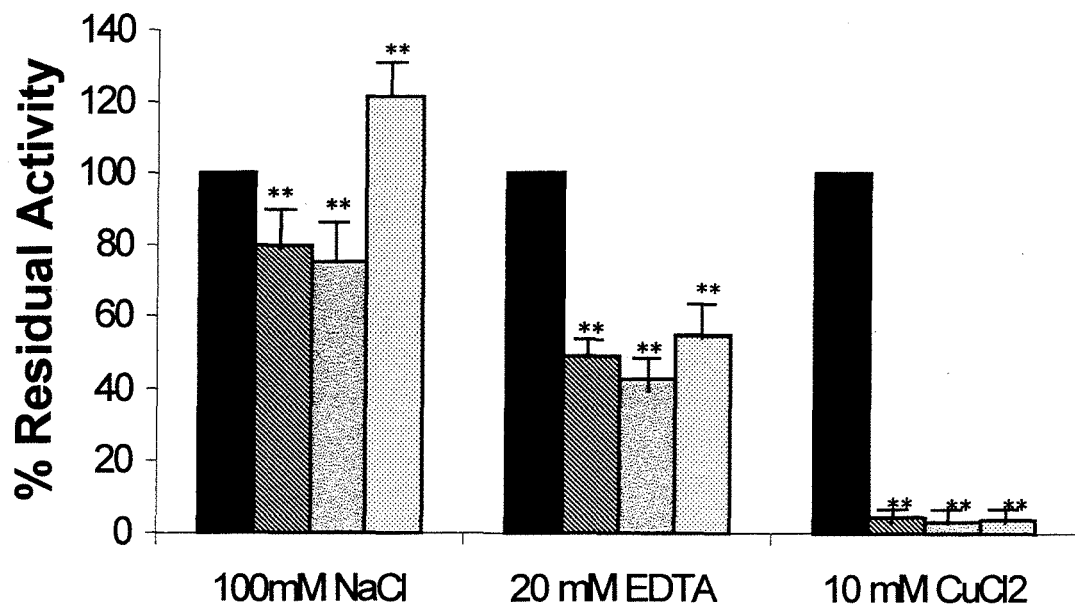
Kinetic values for IDUA from normal individuals and MPS I heterozygotes in the presence and absence of 100 mM NaCl, 20 mM EDTA and 10 mM CuCl₂. Data are reported as mean \pm standard deviation

		Km (mM)	Vmax (nmol/h/mL)
Without inhibitor	Controls	0.22 \pm 0.05	9.76 \pm 2.64
	Group 1	0.37 \pm 0.03	7.54 \pm 1.20
	Group 2	0.42 \pm 0.07	9.55 \pm 4.45
With NaCl	Controls	0.81 \pm 0.11	9.43 \pm 3.34
	Group 1	0.48 \pm 0.04**	7.29 \pm 1.59
	Group 2	0.53 \pm 0.04	13.15 \pm 8.50
With EDTA	Controls	0.48 \pm 0.14	8.11 \pm 1.49
	Group 1	0.67 \pm 0.07 [#]	6.40 \pm 0.53
	Group 2	0.75 \pm 0.19 [#]	8.70 \pm 4.09
With CuCl ₂	Controls	0.21 \pm 0.10	0.23 \pm 0.05
	Group 1	0.38 \pm 0.15 [#]	0.26 \pm 0.20
	Group 2	0.41 \pm 0.15 [#]	0.37 \pm 0.31

Number of individuals: controls = 7, group 1 = 8, and group 2 = 12.

Significantly different from the control group by the Student t test** or one-way ANOVA[#] (p<0.001).

Figure 1



DISCUSSÃO

A detecção de heterozigotos é a medida mais importante para a prevenção de indivíduos afetados nas famílias de alto risco para Mucopolissacaridose tipo I (MPS I). Segundo Neufeldt e Munzer (2001), este é o item assistencial mais requisitado por estas famílias atualmente. Este erro inato do metabolismo é grave e as medidas terapêuticas disponíveis apenas melhoram as condições de vida do paciente, mas não evitam a progressão das manifestações clínicas que, em sua forma mais grave (MPS IH), levam à morte ainda na primeira fase da infância.

Rotineiramente utiliza-se, na detecção de heterozigotos para doenças lisossômicas de depósito (DLD), a medida da atividade da enzima deficiente. Nestes indivíduos, a atividade enzimática encontra-se ao redor de 50% daquela de indivíduos normais. Porém, sabe-se que esta não é uma medida segura, uma vez que muitos indivíduos heterozigotos possuem a atividade enzimática sobreposta

àquela de indivíduos normais, o que dificulta em muito sua identificação (Shapiro, 1981).

Na última década, tem-se discutido muito o emprego das técnicas de biologia molecular para o diagnóstico de doenças hereditárias. Para muitas delas a biologia molecular é de grande utilidade e eficiência. Porém, para a detecção de heterozigotos para MPS I, esta tecnologia não se mostra muito útil. Isto é explicado pelas mais de 50 mutações no gene da IDUA já descritas (Scott et al., 1995), além de vários polimorfismos (Lee-Chen et al., 1999). Para a detecção de portadores, necessita-se conhecer primeiro a mutação do caso índice, o que muitas vezes não é possível.

Até o momento não haviam sido descritas técnicas bioquímicas, baseadas nas propriedades da enzima deficiente para o diagnóstico de indivíduos heterozigotos para MPS I. Esta abordagem já é empregada para o diagnóstico de portadores para Gangliosidose GM1 (Sopelsa et al., 1999) e mostrou-se extremamente eficaz, resolvendo o problema de sobreposição da atividade enzimática entre estes e indivíduos normais para esta DLD.

Estudos em fibroblastos têm demonstrado que a IDUA de indivíduos normais possui características bioquímicas diferentes daquela de indivíduos homozigotos para MPS I e que as características enzimáticas podem ser relacionadas com o genótipo e o curso clínico da doença (Clements et al., 2000; Fujibayshi et al., 1984; Hopwood e Muller, 1979 e Bunge et al., 1998).

Baseado nestas informações, elaborou-se um protocolo bioquímico em que algumas características da IDUA foram pesquisadas em leucócitos e plasma

de indivíduos heterozigotos para MPS I e comparadas com aquelas de indivíduos normais.

Em um primeiro momento, estimou-se a atividade enzimática nos dois grupos de indivíduos. Conforme descrito na literatura, observou-se que, somente pela medida da atividade enzimática em leucócitos, menos de 50% dos heterozigotos estudados puderam ser separados dos indivíduos normais. Quando avaliou-se as amostras de plasma, este método mostrou-se totalmente ineficiente, já que a atividade da IDUA de plasma de heterozigotos para MPS I é semelhante àquela dos controles.

Como estes resultados já eram esperados, passou-se a avaliar algumas características bioquímicas da IDUA: pH ótimo, Km, velocidade máxima (Vmax) e termoestabilidade da enzima a 50°C em amostras de plasma e leucócitos. Além destes parâmetros, utilizou-se também, em plasma, a cotangente do ângulo α e verificou-se a resposta da IDUA de plasma perante compostos como cloreto de sódio, cloreto de cobre e EDTA.

Quanto ao pH ótimo da reação enzimática, verificou-se que a enzima de leucócitos de heterozigotos para MPS I possui pH ótimos em 2,6; 2,7 e 2,8, enquanto que a IDUA de indivíduos normais possui somente um pH ótimo (2,7). Isto faz com que, em leucócitos, uma grande parte de indivíduos heterozigotos sejam diferenciados dos normais apenas pelo pH ótimo da IDUA. Em plasma, o mesmo não ocorreu. Os indivíduos normais tiveram um pH ótimo médio de 2,68, enquanto que, nos heterozigotos, o pH ótimo médio foi de 2,66. Porém, ao analisar os indivíduos heterozigotos em suas subclasses, verificou-se que os pais

de pacientes com MPS I Hurler apresentaram um pH ótimo estatisticamente diferente daquele dos controles e dos demais heterozigotos.

Analisando-se o K_m e a V_{max} , observou-se que, em leucócitos, o K_m não se mostrou um bom parâmetro para identificar heterozigotos para MPS I dentro de uma população de alto risco, pois somente a IDUA de um dos grupos de heterozigotos (grupo 2) teve o K_m estatisticamente diferente daquele da enzima normal. A V_{max} , no entanto, constituiu um parâmetro muito informativo na investigação, pois separou claramente os indivíduos normais dos heterozigotos para MPS I.

O inverso ocorreu com a IDUA de plasma: o K_m da reação enzimática foi um excelente parâmetro na investigação de indivíduos heterozigotos, uma vez que este foi maior para a enzima de heterozigotos para MPS I do que para a IDUA de indivíduos normais. Ao contrário, a V_{max} da reação foi muito semelhante em ambas as populações, o que inviabilizou a distinção destes grupos.

A cotangente do ângulo alfa (C_α), ou seja, a medida da V_{max} dividida pelo K_m , também foi estudada em plasma. Indivíduos normais apresentaram uma C_α significativamente maior que aquela de heterozigotos para MPS I. Esta, portanto, constituiu-se um bom parâmetro na detecção de portadores.

A termoestabilidade a 50°C, tanto em plasma quanto em leucócitos, mostrou ser o melhor parâmetro na detecção de heterozigotos para MPS I. Isto deveu-se à maior estabilidade ao calor da IDUA de portadores. Com apenas 15 minutos de pré-incubação dos leucócitos a 50°C, conseguiu-se separar claramente todos os indivíduos heterozigotos dos controles. O mesmo observou-

se em plasma, porém foi necessário uma pré-incubação a 50°C por um período de tempo maior. Neste material, a IDUA apresenta um comportamento mais termoestável. Assim, foram necessárias 12 ou 24 horas de pré-incubação nessas condições para que houvesse uma separação total entre os dois grupos de indivíduos.

Como última etapa deste trabalho, avaliou-se a resposta da IDUA de heterozigotos para MPS I na presença de três compostos: cloreto de sódio, cloreto de cobre e EDTA, adicionados ao meio de incubação, comparando-a com aquela de indivíduos normais.

O cloreto de sódio 100mM demonstrou ser um inibidor competitivo da enzima de indivíduos normais. Sobre a IDUA de heterozigotos, verificou-se que, curiosamente, ele agia de duas maneiras. A enzima de um grupo de heterozigotos, 40% da amostra, foi inibida pelo NaCl, assim como aquela de indivíduos normais, mas nos outros 60% este composto provocou uma clara ativação da IDUA. Além disso, o Km aparente da IDUA na presença de cloreto de sódio foi diferente entre os indivíduos normais e heterozigotos. Desta forma, o conjunto de respostas da IDUA de indivíduos normais e heterozigotos frente ao NaCl pode ser utilizado na separação destes dois grupos de indivíduos.

A adição de EDTA 20 mM ao ensaio enzimático causou uma inibição do tipo competitiva em ambos os grupos de indivíduos. Verificou-se, também, que o Km aparente da IDUA de heterozigotos era maior do que o Km aparente da enzima de indivíduos normais. Em relação ao K_i , não houve separação destes grupos. Mesmo assim, a adição de EDTA ao ensaio enzimático foi útil na

detecção de heterozigotos para MPS I, quando analisado seu efeito em relação ao Km aparente obtido.

Por último, observou-se que o cloreto de cobre 10 mM foi um potente inibidor da IDUA nos dois grupos analisados, causando uma inibição do tipo não-competitiva. O Ki foi semelhante nos dois grupos, mas o Km aparente da reação enzimática, na presença do CuCl_2 , foi significativamente diferente, podendo, este procedimento, ser utilizado na detecção de heterozigotos.

Com base nos parâmetros cinéticos e bioquímicos da IDUA avaliados neste estudo, verificou-se que a enzima de heterozigotos para MPS I é diferente daquela de indivíduos normais, o que permite uma clara distinção entre os dois grupos.

Consideramos que o melhor parâmetro a ser utilizado na detecção de heterozigotos, devido à facilidade técnica, foi a pré-incubação da IDUA a 50°C por 15 minutos para leucócitos e, 12 ou 24 horas, para plasma. Este teste mostrou ser simples e eficiente para a detecção de heterozigotos para a MPS I, podendo ser utilizado na triagem de famílias de alto risco.

É importante enfatizar que as mutações no gene da IDUA dos indivíduos heterozigotos analisados neste trabalho não eram conhecidas. Sendo assim, é possível que nossa amostra seja muito heterogênea. Não podemos, portanto, estender nossos resultados a toda a população de heterozigotos para MPS I. Para tanto, novos estudos devem ser realizados.

Apesar disso, é importante salientar que observamos respostas diferentes da IDUA de plasma de portadores para MPS I Hurler, Scheie e Hurler/Scheie, mostrando que há uma correlação entre a resposta bioquímica e o

fenótipo dos filhos destes indivíduos. Isto está de acordo com Clements et al. (2000) que obteve uma correlação entre o fenótipo de homozigotos para MPS I com as características bioquímicas da IDUA destes indivíduos.

Neste contexto, nossos resultados também estão de acordo com Le-Chen et al. (1999), que demonstraram um grande número de mutações no gene da IDUA na síndrome de Hurler, mas somente poucas mutações conhecidas nas síndromes de Scheie e de Hurler/Scheie. Estes autores afirmam que existem mutações específicas para cada caso e cada uma pode causar uma resposta diferente, como redução na atividade enzimática, causando ou não redução na síntese do mRNA para a IDUA ou mesmo redução na concentração, função ou viabilidade da IDUA formada.

CONCLUSÕES

1. A medida da atividade da IDUA em leucócitos revelou que os heterozigotos para MPS I podem ser divididos em dois grupos, um com atividade enzimática semelhante a dos homozigotos normais e outro com atividade enzimática inferior a dos controles.
2. A atividade enzimática da IDUA em plasma de indivíduos heterozigotos para MPS I foi semelhante àquela de indivíduos normais.
3. A IDUA de leucócitos de heterozigotos para MPS I apresentou três pH ótimos, enquanto a de indivíduos normais apresentou somente um. Em plasma, todos os grupos tiveram pH ótimo semelhante.
4. O Km da IDUA de leucócitos de indivíduos normais foi semelhante àquela do grupo 1 de heterozigotos para MPS I e maior do que o do grupo 2. Em plasma, o Km da enzima de heterozigotos foi maior que aquela da enzima de indivíduos normais.

5. A V_{max} da enzima de leucócitos de indivíduos normais foi diferente daquelas dos dois grupos de heterozigotos para MPS I. A V_{max} da IDUA de plasma de heterozigotos foi semelhante àquela da enzima de indivíduos normais.
6. A C_{α} da enzima de plasma de heterozigotos para MPS I foi menor que aquela de homozigotos normais.
7. A IDUA de leucócitos de heterozigotos para MPS I e de indivíduos normais, foi inativada após pré-incubação a 15, 30, 45 e 60 minutos a 50°C. Os dois grupos diferiram significativamente após 15, 30 e 60 minutos de pré-incubação a 50°C.
8. A enzima de plasma de indivíduos normais e heterozigotos para MPS I foi inativada após pré-incubação a 1, 3, 5, 12 e 24 horas a 50°C. Os dois grupos diferiram significativamente após 12 e 24 horas de pré-incubação a 50°C.
9. NaCl 100 mM inibiu competitivamente a IDUA de plasma de indivíduos normais e de 40% dos heterozigotos para MPS I avaliados. Os demais heterozigotos (60%) tiveram sua IDUA ativada por este composto. O K_m aparente da enzima de indivíduos normais, na presença do inibidor, foi maior que aquele da enzima do grupo 1 de heterozigotos e a V_{max} foi semelhante nos dois grupos. O K_i da enzima de indivíduos normais foi menor que aquele da enzima de heterozigotos para MPS I.
10. EDTA 20 mM inibiu a enzima de plasma de heterozigotos para MPS I e de indivíduos normais competitivamente. O K_m aparente

da enzima de indivíduos normais, na presença deste composto, foi menor que aquele da enzima de heterozigotos para MPS I. A V_{max} aparente e o K_i da IDUA foram semelhantes em todos os grupos avaliados.

11. $CuCl_2$ 10 mM foi um potente inibidor não-competitivo, tanto da enzima de indivíduos normais quanto daquela de heterozigotos para MPS I. O K_m aparente da enzima de indivíduos normais, na presença de $CuCl_2$, foi menor que aqueles dos dois grupos de heterozigotos. O K_i e a V_{max} aparente da reação enzimática foram semelhantes nos três grupos avaliados.
12. A incubação da IDUA a $50^\circ C$ por 15 minutos (leucócitos), ou 12 ou 24 horas (plasma), antes da adição do substrato da reação, mostrou ser um simples e eficiente teste para a detecção de heterozigotos para a MPS I. Este método pode ser utilizado para a triagem de famílias de alto risco.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Anderson WAD e Kissane JM Patologia. Vol. I. 7^a ed Guanabara Koogan. Rio de Janeiro. RJ; 1982.

Ashton LJ, Brooks DA, McCourt PAG, Muller VJ, Clements PR and Hopwood JJ. Immunoquantification and enzyme kinetics of α -L-iduronidase in cultured fibroblasts from normal controls and mucopolysaccharidosis type I patients. Am J Hum Genet 1992; 50:787-794.

Bach, G.; Friedman, R.; Weissmann, B. and Neufeld, EF. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1972; 69:2048-2051.

Barton, RW., and Neufeld, EF. J. Biol. Chem. 1971; 246:7773 – 7779.

Bunge S, Clements PR, Byers S, Kleijer WJ, Brooks DA and Hopwood JJ. Genotype-phenotype correlations in mucopolysaccharidosis type I using enzyme kinetics, immunoquantification and in vitro turnover studies. Biochim Biophys Acta 1998; 1407:249-256.

Clarke LA, Russel C, Brooks D, Matolock T, Gibson S, Pourbahrami T et al. Enzyme replacement in a murine model for MPS I [Abstract]. In: 5th International Symposium ou Mucopolysaccharide and Related Disorders Program; 1999 March 18-2; Viena. P87. Abstr nº 058.

Cleary MA, Wraith JE. The presenting features of mucopolysaccharidosis type IH (Hurler syndrome). Acta Pediatr 1995; 84:337-339.

Clements PR, Brooks DA, McCourt PAG, Hopwood JJ. Immunopurification and

characterization of human α -L-iduronidase with the use of monoclonal antibodies. *Biochem J* 1989; 259: 199-208.

Clements PR, Muller V and Hopwood JJ. Homan α -L-iduronidase 2. Catalytic properties. *Eur J Biochem* 1995; 152:29-34.

Clements PR, Yogalingam G, Brooks DA, Muller VJ and Hopwood JJ. α -L-iduronidase genotype/protein function relationships in MPS I fibroblasts *J Inher Metab Dis* 2000; 23:237.

Coelho JC, Wajner M, Burin MG, Vargas CR, Giugliani R. Selective screening of 10.000 high-risk Brazilian patients for the detection of inborn errors of metabolism. *Eu J Pediatr* 1997; 156:650-654.

Conzelman, PR. And Sandhoff, K. Partial enzyme deficiencies: residual activities and the development of neurological disorders. *Dev Neurosci* 1983; 6:58-71.

Den Tand WR, Scharpe S. Characteristics of leukocyte and plasma methylumbelliferyl- α -L-iduronide iduronidase. *Biochem Med Metab Biol* 1989; 41: 18-24.

Dulaney JT, Milunski A and Moser HW. Detection of the carrier state of Hurler's syndrome by assay of α -L-iduronidase in leukocytes. *Clin Chim Acta* 1976; 69:305-310.

Fairbairn LJ, Lashford LS, Spooncer E, McDermott RH, Lebens G, et al. Long-term in vitro correction of α -L-iduronidase deficiency (Hurler syndrome) in human bone marrow. *Proc Nat Acad Sci USA* 1996; 93: 2025-2030.

Fairbairn LI, Spooncer E, Hatton CE, Cooper A, Besley GNT, Wraith JE et al. Phase I trial of bone marrow gene therapy for MPS I [Abstract]. In: In: 5th International Symposium on Mucopolysaccharide and Related Disorders Program; 1999 March 18-2; Viena. P103. Abstr n° 072.

Field RE, Buchanan JAF, Coplemans MGJ, Aichroth PM. Bone-marrow transplantation in Hurler syndrome. *J Bone Joint Surg [Br]* 1994; 76-B: 975-981.

Flemming DR, Henslee-Downey PJ, Ciocci G, Romond EH, Marciniak E, Munn RK, et al. The use of partially HLA-mismatched donors for allogeneic transplantation in patients with mucopolysaccharidoses I. *Pediatr Transplantation* 1998; 2:299-304.

Frantatoni, JC.; Hall, CW. and Neufeld, EF. Hurler and Hunter syndromes: mutual correction of the defect in cultured fibroblast *Science* 1968; 162:570-572.

Fratantoni JC, Hall CW, Neufeld EF: The defect in Hurler and Hunter syndromes, II. Deficiency of specific factors involved in mucopolysaccharide degradation. *Proc Natl Acad Sci USA* 64:360-366, 1969.

Fujibayashi S, Minami R, Ishikawa Y, Wagatsuma K, Nakao T and Tsugawa S. Properties of α -L-iduronidase in cultured skin fibroblasts from α -L-iduronidase-deficient patients. *Human Genet* 1984; 65:268-272.

Gibbs DA, Spellacy E, Tompkins R, Watts RW. A clinical trial of fibroblast transplantation for the treatment of mucopolysaccharidoses. *J Inher Metab Dis* 1983; 6:62-81.

Gilbeert – Barness and Barness L. *Metabolic Diseases*. Vol 1. Eaton Publishing Natick. 2000; Pp. 249-262..

Goldenfum, SL Diagnóstico Diferencial das MPS: Um estudo de 40 casos no Brasil. Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em Ciências Biológicas- Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. POA. RS, 1990.

Guffon N, Soillet G, Maire I, Strackzer J, Guibaud P. Follow-up of nine patients with Hurler syndrome after bone marrow transplantation. *J Pediatr* 1998; 133(1):119-125.

Hall CW, Neufeld EF. α -L-iduronidase activity in cultured skin fibroblast and amniotic fluid cells. *Arch Biochem Biophys* 1973;158:817.

HGMD - The human gene mutation database Cardiff - <http://archive.uwcm.ac.uk/>.

Hobbs JR, Barret AJ, Chambers D, James D, Hugh-Jones K, et al. Reversal of clinical features of Hurler's disease and biochemical improvement after treatment by bone-marrow transplantation. *Lancet* 1981; 2:709-712.

Hopwood JJ and Muller V. Biochemical discrimination of Hurler and Scheie syndromes. *Clin Sci* 1979; 57:265-272.

Huang MM, Kakkis E, Neufeld EF, Kohn DB. Retroviral mediated human uronidase gene transfer into bone marrow cells – potential gene therapy for Hurler syndrome. (Abstract) 4th International Symposium on Mucopolysaccharide and Related Disorders. Wollogong, Australia, 1996:46.

Huang MM, Wong A, Yu X, Kakkis E, Kohn DB. Retrovirus-mediated transfer of the human alpha-L-iduronidase cDNA into human hepatopoietic progenitor cells leads to correction in trans of Hurler fibroblasts. *Gene Ther* 1997;4:1150-1159.

Kakkis ED, McEntee MF, Schmidtchen A, Neufeld EF, Ward DA, Gompf RE et al. Long-term and high-dose trials of enzyme replacement therapy in the canine model of mucopolysaccharidoses I. *Biochem Mol Med* 1996; 58:156-167.

Kakkis ED, MUENZER J, Tiller GE, Waber L, Belmont J, Passage M, Izykowski B, Phillips J, Doroshov R, Wallot I, Hoft R, Neufeld EF. Enzyme-replacement therapy in mucopolysaccharidosis I. *New Eng. J. Med.* 2001; 182-188.

Kleijer WJ, Hensing-Wolffers GM, Thompson EJ, Niermeijer MF. The Hurler

syndrome: detection of patients and heterozygotes using a microassay for α -L-iduronidase in fibroblast. *Clin. Chim. Acta.* 1981; 116:47-54.

Krivit W, Shapiro ES, Lockman LA, Balthazor M, Wagner J, Peters C et al. Bone marrow transplantation treatment for globoid cell leukodystrophy, adrenoleukodystrophy and Hurler syndrome. In: Moser HW, editor. *Handbook of Clinical Neurology*. New York: Elsevier Science BV. 1996. P 87-106.

Lavery C. A European Database to identify the Incidence and Epidemiology of Mucopolysaccharide Diseases. (Abstract) 4th International Symposium on Mucopolysaccharide and Related Disorders. Wollogong, Australia, 1996:16.

Lee-Chen GJ, Lin SP, Tang YF and Chin YW. Mucopolysaccharidosis type I: characterization of novel mutations affecting α -L-iduronidase activity. *Clin Genet* 1999; 56:66-70.

Lowry RB, Renwick DHG. Relative frequency of the Hurler and Hunter syndromes. *N Engl J Med* 1971; 284:221-222.

Matalon R and Dorfman A. Hurler's syndrome, and α -L-iduronidase deficiency. *Biochem Biophys Res Commun* 1972; 47: 959-964.

Matte U, Leistner S, Lima L, Schwartz I, Giugliani R. Unique frequency of known mutations in Brazilian MPS I patients. *A.m. J. Hum Genet* 2000; 90:108-109.

Matte US, Giugliani R. Caracterização molecular de pacientes com mucopolissacaridose tipo I: um estudo no Brasil. Dissertação de Mestrado do Curso de Pós-Graduação em Biologia: Genética e biologia molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre. 1998.

McKusick VA, Neufeld, EF. In the metabolic Basis of Inherited Disease (Stanbury JB, Wyngaarden JB, Fredrickson DS, Goldstein JL, Brown MS, eds) 6th Ed., 1993; pp. 751-777, McGraw-Hill, New York.

McKusick VA, Neufeld, EF. In the metabolic Basis of Inherited Disease (Stanbury JB, Wyngaarden JB, Fredrickson DS, Goldstein JL, Brown MS eds) 5th Ed., 1983; pp. 751, McGraw-Hill, New York.

Meikle PJ, Hopwood JJ, Clague AE, Carey WF. Prevalence of lysosomal storage disorders. *JAMA* 1999; 281 (3):249-254.

Muenzer J. Mucopolysaccharidoses. *Adv Pediatr* 1986; 33:269-302.

Myerowitz R, Neufeld EF. Maturation of α -L-iduronidase in cultured human fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 1981; 256:3044-3048.

Navarro C, Dominguez C, Costa M, Ortega JJ. Bone marrow transplant in a case of mucopolysaccharidosis I Scheie phenotype: skin ultrastructure before and after transplantation. 1991; *Acta Neuropathol* 82:33-38.

Nelson PV. Risk, Reaction and Realities of Carrier Status: What Do Statistics Mean to You? A professional view. (Abstract) 4th International Symposium on Mucopolysaccharide and Related Disorders. Wollongong, Australia, 1996:29.

Neufeld EF, Muenzer J. The Mucopolysaccharidosis. In Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease. 7th edn. Pp. 2465-2494. New York: McGraw-Hill, 1995.

Neufeld EF, Muenzer J. The Mucopolysaccharidosis. In Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease. 8th edn. Pp. 3421-3442. New York: McGraw-Hill, 2001.

Peters C, Balthazor M, Shapiro EG, King RJ, Kollman C, Hegland Jd et al. Outcome of unrelated donor bone marrow transplantation in 40 children with Hurler syndrome. Blood 1996; 87:4894-4902.

Peters C, Shapiro EG, Anderson J, Henslee-Downey J, Klemperer MR, Cowan MJ et al. Hurler syndrome: II. Outcome of HLA-genotypically identical sibling and HLA-haploidentical related donor bone marrow transplantation in fifty-four children. Blood 1998; 91: 2601-2608.

Poorthuis BJHM, Wevers RA, Kleijer WJ, Groener JEM, de Jong JGN, van Weely S et al. The frequency of lysosomal storage diseases in The Netherlands. Hum Genet 1999; 105: 151-156.

Rome LH, Garvin AJ and Neufeld EF. Human kidney α -L-iduronidase: purification and characterization. Arch Biochem Biophys 1978; 189:344-353.

Rosenberg RD, Shworak NW, Liu J, Schwartz JJ, Zhang L. Heparan sulfate proteoglycans of the cardiovascular system. Specific structures emerge but how is synthesis regulated? J Clin Invest 1997; 99(9): 2062-2070.

Schuchman EH, Astrin KH, Aula P, Desnick RJ. Regional assignment of the structural gene for human alpha-L-iduronidase. Proc Nat Acad Sci USA 1984;81:1169-1173.

Schwartz IVD, Giugliani R. Mucopolissacaridose tipo I – análise da variabilidade clínica e sua associação com o genótipo em pacientes brasileiros. Dissertação de Mestrado do Curso de Pós-Graduação em Biologia: Genética e Biologia molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre. 2000.

Scott Hs, Anson DS, Orsborn A.M., Nelson PV, Clements PR et al. Human α -L-iduronidase: cDNA isolation and expression. Proc Natl Acad Sci USA 1991 a;88:9695-9699.

Scott HS, Ashton LJ, Eyre HJ, Baker E, Brooks DA, Callen DF, Shuterland GR, Morris CP. Chromosomal localization of the human α -L-iduronidase gene (IDUA) to 4p 16.3. *A.m. J Hum Genet* 1990; 47:802-807.

Scott HS, Bunge S, Gal A, Clarke LA, Morris CP, Hopwood JJ. Molecular genetics of mucopolysaccharidosis type I: diagnostic, clinical and biological implications. *Hum Mutat* 1995; 6:288-302.

Scott HS, Guo XH, Hopwood JJ, Morris CP. Structure and sequence of the human α -L iduronidase gene. *Genomics* 1992 a;13:1311-1313.

Scott HS, Litjens T, Hopwood JJ, Morris CP. A common mutation for mucopolysaccharidosis type I associated with a severe Hurler syndrome phenotype. *Hum Mutat* 1992d;1:103-108.

Scott HS, Litjens T, Hopwood JJ, Morris CP. PCR detection of two RFLPs in exon I of the α -L-iduronidase (IDUA) gene. *Hum Genet* 1992c;90:327.

Scott HS, Litjens T, Nelson PV, Broocks DA, Hopwood JJ et al. α -L-iduronidase mutations (Q70X and P533R) associated with a severe Hurler phenotype. *Hum Mutat* 1992e;1:333-339.

Scott HS, Nelson PV, Litjens T, Hopwood JJ, Morris CP. Multiple polymorphisms within the α -L-iduronidase gene (IDUA): Implications for a role in modification of MPS I disease phenotype. *Hum Mol Genet* 1993b;2:1471-1473.

Scott HS, Nelson PV, McDonald ME, Gusella JF, Hopwood JJ et al. Na 86 bp VNTR within IDUA is the basis of the D4S111 polymorphic locus. *Genomics* 1992b; 14:1118-1120.

Scott HS, Nelson PV, Morris CP, Hopwood JJ. PCR of a Kpn I RFPL in the α -L-iduronidase gene. *Nucleic Acids Res* 1991c; 19:5796.

Scott HS, Nelson PV, Morris CP, Hopwood JJ. PCR of a VNTR linked to mucopolysaccharidoses type one and Huntington disease. *Nucleic Acids Res* 1991b; 19:6348.

Severini M. Caracterização Clínico-Epidemiológica da Gangliosidose GM1 Tipo 1 no Sul do Brasil. Dissertação de Mestrado do Curso de Pós-Graduação em Medicina: Pediatria da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre. 1999.

Shapira E, Blitzer M, Miller J, Africk D. *Biochemical Genetics*. Oxford University Press, 1989:126.

Shapiro LJ, Hall CW, Leder IG, Neufeld EF. The relation of α -L-iduronidase and Hurler corrective factor. *Arc Biochem Biophys*. 1976; 172:156-161.

Shapiro LJ. Current status and future direction for carrier detection in lysosomal storage diseases. In: Callahan JW, Lowden JA, eds. *Lysosomes and Lysosomal Storage Disease*. New York, Raven Press; 1981. p.343.

Shull RM, Kakkis ED, McEntee MF, Kania AS, Jonas AJ, Neufeld EF. Enzyme replacement in a canine model of Hurler syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 12937-12941.

Shull RM, Lu X, McEntee MF, Bright RM, Pepper KA, Kohn DB. Myoblast gene therapy in canine mucopolysaccharidosis, I: abrogation by an immune response to alpha-L-iduronidase. *Hum Gene Ther* 1996; 7: 1595-1603.

Singh J, Niebes P and DiFerrante N. A method for α -L-iduronidase assay. *FEBS Lett* 1974; 45:248-251.

Sopelsa AMI, Severini MHA, Silva, CMD, Tobo PR, Giugliani R and Coelho JC. Characterization of β -galactosidase in leukocytes and fibroblasts of GM1 gangliosidosis heterozygotes compared to normal subjects. *Clin Biochem* 1999; 33:125-130.

Stringer SE, Gallagher JT. Heparan sulphate. *Int J Biochem Cell Biol* 1997; 29 (5): 709-714.

Taylor JA, Gibson GJ, Broocks DA, Hopwood JJ. α -L-iduronidase in normal and mucopolysaccharidosis-type-I human skin fibroblasts. *Biochem J* 1991;274:263-268.

Unger EG, Durrant J, Anson DS and Hopwood JJ. Recombinant α -L-iduronidase: characterization of the purified enzyme and correction of mucopolysaccharidosis type I fibroblasts. *Biochem J* 1994; 304:43-9.

Vellodi A, Young EP, Cooper A, Wraith JE, Winchester B, Meaney C et al. Bone marrow transplantation for mucopolysaccharidosis type I: experience of two British centres. *Arch Dis Child* 1997; 76 92-99.

Weissmann B, Santiago R. α -L-iduronidase in lysosomal extracts. *Biochem. Biophys. Res.* 1972; 46:1430-1433.

Whitley CB, Krivit W, Ramsay NKC, Kersey JH, Chang RE et al. Mutation analysis and clinical outcome of patients with Hurler syndrome (mucopolysaccharidosis type I-H) undergoing bone marrow transplantation. *A.m. J Hum Genet* 1993;52:A101.

Winchester B. Lysosomal Metabolism of Glycoconjugates. In: *Subcellular Biochemistry*. Vol. 27, *Biology of the Lysosome* ed. Lloyd & Mason. Plenum Press, New York, 1996;191-238.