

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular

**LEUCODISTROFIA METACROMÁTICA: CARACTERIZAÇÃO  
EPIDEMIOLÓGICA, BIOQUÍMICA E CLÍNICA DE PACIENTES BRASILEIROS**

Oswaldo Alfonso Pinto Artigalás

*Dissertação submetida ao Programa de  
Pós Graduação em Genética e Biologia  
Molecular da Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul como requisito parcial  
para obtenção do grau de Mestre.*

Orientadora: Profa. Dra. Ida Vanessa Doederlein Schwartz

Porto Alegre, março de 2009.

Esse trabalho foi realizado no Serviço de Genética Médica, localizado no Hospital de Clínicas de Porto Alegre, com recursos do CNPq, FIPE-HCPA, ONG Pela Vida, Rede MPS Brasil e Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a todos aqueles que, de forma direta ou indireta, ajudaram na conclusão desse trabalho.

Às Agências Financiadoras deste Projeto, FINEP/HCPA e CNPq, e a Organização Pela Vida e Rede MPS Brasil, pelo incentivo à pesquisa sobre Leucodistrofia Metacromática.

Aos professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS pela dedicação e disponibilidade infindáveis nestes dois anos de convívio.

Aos professores, colegas e amigos do Serviço de Genética Médica do HCPA, pela amizade e o crescimento profissional e científico dentro da Genética Médica proporcionado durante o período de Residência e nos anos que se seguiram.

Aos Professores Lavínia Schüller-Faccini e Roberto Giugliani que fizeram parte da minha iniciação acadêmica dentro da Genética e sempre me incentivaram a dar continuidade a ela.

A minha orientadora Professora Ida Schwartz, pelo exemplo profissional e dedicação. E por acreditar na ciência como um instrumento transformador da sociedade.

Aos colegas e amigos de Mestrado e do Centro de Terapia Gênica, pela convivência, aprendizado nas discussões e momentos de descontração.

Ao meu filho, à Luciane, aos meus pais, ao meu irmão e aos meus familiares, pelo amor, dedicação e apoio incondicional.

## SUMÁRIO

<b>SUMÁRIO</b> .....	4
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	6
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	7
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	8
<b>RESUMO</b> .....	10
<b>ABSTRACT</b> .....	12
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	14
1.1. Aspectos Históricos .....	14
1.2. Epidemiologia .....	15
1.3. Aspectos Clínicos .....	17
1.3.1 Diagnósticos diferenciais .....	17
1.3.2 Formas clínicas da LDM .....	18
1.3.3 Exames complementares .....	22
1.4. Aspectos Bioquímicos .....	25
1.4.3 Outras condições que também provocam atividade deficiente da ARSA .....	28
1.4.3.1 Deficiência de saposina B .....	28
1.4.3.2 Deficiência de SUMF1 .....	29
1.4.3.3 Pseudodeficiência de ARSA .....	31
1.5. Aspectos Genéticos .....	33
1.6. Diagnóstico .....	35
1.6.1 Diagnóstico bioquímico .....	35
1.6.2 Diagnóstico genético .....	37
1.6.3 Diagnóstico histopatológico .....	37
1.7. Tratamento .....	39
<b>2. JUSTIFICATIVAS</b> .....	43
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	44
3.1 Objetivo Geral .....	44
3.2 Objetivos Específicos .....	44

<b>4. ARTIGO 1:</b> Clinical and biochemical study of 29 patients with metachromatic leukodystrophy .....	45
<b>5. ARTIGO 2:</b> Del22q13 syndrome: another condition to be considered in the differential diagnosis of arylsulfatase A deficiency .....	64
<b>6. ARTIGO 3:</b> Multiple Sulfatase Deficiency: a misdiagnosed condition? ...	75
<b>7. ARTIGO 4:</b> Punctate calcifications in lysosomal storage disorders .....	91
<b>8. DISCUSSÃO</b> .....	98
8.1 Dificuldades diagnósticas e subdiagnóstico de LDM no Brasil ...	98
8.2 Caracterização dos pacientes brasileiros com LDM .....	102
8.3 Deficiência de ARSA: ampliando o espectro diagnóstico e descrevendo doenças raras .....	105
8.4 Triagem neonatal para doenças lisossômicas .....	108
<b>9. CONCLUSÃO</b> .....	110
<b>10. PERSPECTIVAS</b> .....	113
10.1 Caracterização clínica e da história natural da LDM .....	113
10.2 Modelo animal de LDM .....	113
10.3 Terapia de reposição enzimática para LDM .....	114
10.4 Estudos de correlação fenótipo-genótipo .....	114
10.5 Investigação de deficiência de ARSA em grupos de risco .....	115
<b>11. REFERÊNCIAS</b> .....	116

## **ANEXOS**

Ficha de avaliação clínica

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Tabela 1. Descrição sumarizada dos principais achados encontrados nos 29 pacientes com LDM

Aprovação do projeto de pesquisa junto ao Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre

## LISTA DE TABELAS

<b>Quadro 1.</b> Principais diagnósticos diferenciais de LDM .....	18
<b>Quadro 2.</b> Formas da LDM: manifestações clínicas, diagnósticos diferenciais e exames laboratoriais .....	21
<b>Quadro 3.</b> Sulfatases humanas .....	30
<b>Quadro 4.</b> Combinações entre os alelos selvagens, de mutações de PD-ARSA e de mutações de LDM .....	33
<b>Quadro 5.</b> Condições a serem consideradas no diagnóstico diferencial de deficiência de arilsulfatase A .....	37
<b>Tabela 1.</b> Descrição sumarizada dos principais achados encontrados nos 29 pacientes com LDM (Parte I) .....	138
<b>Tabela 1.</b> Descrição sumarizada dos principais achados encontrados nos 29 pacientes com LDM (Parte II) .....	139

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Microscopia óptica de tecido cerebral de paciente com LDM corada com violeta de cresil .....	15
<b>Figura 2.</b> Ressonância nuclear magnética de LDM juvenil .....	23
<b>Figura 3.</b> Rota de degradação de cerebrosídeo sulfato .....	26
<b>Figura 4.</b> Estrutura química do sulfatídeo .....	27
<b>Figura 5.</b> Microscopia eletrônica de fibroblastos de paciente com LDM ...	38
<b>Figura 6.</b> Fluxograma do diagnóstico bioquímico da LDM e de seus diagnósticos diferenciais .....	100
<b>Figura 7.</b> Aspectos dismórficos faciais de pacientes com a síndrome de deleção 22q13 .....	107

## LISTA DE ABREVIATURAS

(0) – alelo nulo

ARSA – arilsulfatase A

ARSB – arilsulfatase B

BMP – proteína básica de mielina

CDPX – condrodissplasia punctata recessiva ligada ao X

CGH array – Hibridização Genômica Comparativa

CP – calcificações punctatas

Cys69 – cisteína 69

DL – doenças lisossômicas

DMS – deficiência múltipla de sulfatases

DNA – ácido desoxirribonucleico

EIM – erros inatos do metabolismo

ENMG – eletroneuromiografia

FA – fosfatase alcalina

FGE – enzima geradora de formilglicina

FISH – hibridização com fluorescência *in situ*

GABA – ácido gama-aminobutírico

ICX – ictiose ligada ao X

LDM – leucodistrofia metacromática

LEIM – Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo

ML II – mucopolidose II

MPS – mucopolissacaridose

NCS – 4-nitrocatecol sulfato

NO – óxido nítrico

ONG – organização não-governamental

PAPS - 3'-fosfoadenosina-5'-fosfato

pb – pares de base

PCR – reação da polimerase em cadeia

PD-ARSA – pseudodeficiência de ARSA

PEA – potencial evocado auditivo

PESS – potencial evocado somatossensitivo  
PEV – potencial evocado visual  
PTH – paratormônio  
(R) – alelo residual  
rhARSA – enzima arilsulfatase A humana recombinante  
RE – retículo endoplasmático  
RM6P – receptor de manose-6-fosfato  
RNM – ressonância nuclear magnética  
SGM-HCPA – Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre  
SNC – sistema nervoso central  
TACH – transplante alogênico de células hematopoiéticas  
TC – tomografia computadorizada  
TG – terapia gênica  
TMO – transplante de medula óssea  
TRE – terapia de reposição enzimática

## RESUMO

**Introdução:** A leucodistrofia metacromática (LDM) é um EIM, do grupo das doenças lisossômicas (DL) de herança autossômica recessiva, causado pela atividade deficiente de arilsulfatase A (ARSA), uma enzima lisossômica envolvida na degradação de glicolipídeos sulfatados. O gene *ARSA* em humanos está localizado no cromossomo 22q13. Dados epidemiológicos demonstram uma prevalência de 1,4–1,8 para 100.000 nascimentos. De uma forma geral, essa doença é classificada em três formas clínicas, de acordo com a idade de início das manifestações: infantil tardia (0-4 anos), juvenil (4-15 anos) e adulta (mais de 15 anos). As formas infantil tardia e juvenil apresentam fenótipo mais grave do que a forma adulta. As opções de tratamento da LDM ainda são bastante restritas, resumindo-se principalmente ao manejo de suporte. **Objetivos:** Caracterizar os aspectos epidemiológicos, clínicos e bioquímicos da LDM em pacientes brasileiros, de forma a contribuir para o melhor entendimento da evolução dessa doença, bem como, outras condições clínicas associadas à deficiência de ARSA. **Metodologia:** Estudo observacional, transversal, com componente retrospectivo, de uma série de casos de LDM. A amostra foi identificada a partir da revisão de aproximadamente 30.000 registros do Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (LEIM/HCPA) e Organização Não-Governamental Pela Vida, de 1983-2007. Para inclusão no estudo, o paciente deveria ter atividade reduzida de ARSA e exclusão de pseudodeficiência de ARSA. Para os pacientes que concordaram participar do estudo, foi preenchida uma ficha de avaliação clínica. **Resultados:** Foram identificados 35 casos de LDM, sendo que 29 (sexo masculino: 16; média de idade: 8,6 anos), de 26 famílias, concordaram em participar do estudo. Entre os pacientes incluídos, apenas um já havia falecido no momento da realização do estudo. A taxa de consangüinidade parental encontrada foi de 38,4%. Nenhum dos pacientes incluídos havia realizado TMO. A origem dos pacientes, considerando a região brasileira de nascimento, foi heterogênea, embora com predominância na região Sudeste (51,7%). Dos 29 casos descritos, houve predominância da forma infantil tardia, com 22 (75,8%)

casos descritos. A média de idade ao diagnóstico dos pacientes com LDM infantil tardia foi de 39,05 meses, em média 21,05 meses após o início dos sintomas. Na forma juvenil, a média de idade ao diagnóstico foi de 161,25 meses, ou seja, 76,5 meses, em média, após o início dos sintomas. Não foi encontrada correlação estatisticamente significativa ( $r=-0,09$ ,  $p=0,67$ ) entre os níveis de atividade de ARSA e a idade de início dos sintomas. As manifestações motoras, principalmente aquelas relacionadas à marcha, mostraram predominância no início do quadro clínico dos pacientes com a forma infantil (72,7%), estando também presentes na forma juvenil, mas em proporção semelhante às alterações cognitivas e comportamentais (50%). Na forma infantil tardia, 13/21 pacientes mostravam sinais de desmielinização difusa na ressonância nuclear magnética de cérebro, e nenhum dos 21 casos apresentava desmielinização isolada ou inicial em região fronto-temporal ou núcleos da base. A eletroneuromiografia mostrou-se alterada em praticamente todos os casos que realizaram o exame ( $n=12/13$ ). Entre os pacientes com atividade reduzida de ARSA identificados pelo LEIM/HCPA, e que não preencheram os critérios para inclusão no estudo, figuram os primeiros pacientes brasileiros com deficiência múltipla de sulfatases e com síndrome da del22q13 descritos na literatura. **Discussão/Conclusões:** A LDM apresenta ampla distribuição geográfica no Brasil. O atraso no diagnóstico desses pacientes, e a confusão existente quando da necessidade de estabelecimento dos diagnósticos diferenciais de deficiência de ARSA, indicam que existe pouco conhecimento, por parte dos profissionais de saúde, a respeito dessas doenças, além de um reduzido número de laboratórios e médicos habilitados para o estabelecimento desse diagnóstico no país. O predomínio da forma infantil tardia da LDM na amostra estudada pode ser indicativa de subdiagnóstico das demais formas. Os dados obtidos também sugerem que a presença de calcificações punctatas deve ser considerada um achado radiológico sugestivo de DL, e que a síndrome de del22q13 deve passar a constar da lista de diagnósticos diferenciais de deficiência de ARSA.

## ABSTRACT

**Introduction:** Metachromatic leukodystrophy (MLD) is an IEM, from the group of lysosomal diseases (LD), with autosomal recessive inheritance, caused by deficient activity of arylsulfatase A (ARSA), a lysosomal enzyme involved in degradation of sulfated glycolipids. The *ARSA* gene in humans is located on chromosome 22q13. Epidemiological data shows a prevalence at birth of 1.4-1.8 to 100,000. In general, this disease is classified into three clinical forms, according to the age of onset: late infantile (0-4 years), juvenile (4-15 years) and adult (over 15 years). The late infantile and juvenile forms have more severe phenotype than adult form. Nowadays, the treatment options for MLD are limited to support management. **Aims:** To characterize the epidemiological, clinical, and biochemical aspects of MLD in Brazilian patients to contribute to a better understanding of the evolution of the disease and other medical conditions associated with ARSA deficiency. **Methodology:** Observational, transversal study, with retrospective component, of a series of cases of MLD. The sample was identified by reviewing approximately 30,000 medical records of the Laboratory of Inborn Errors of Metabolism, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (LIEM/HCPA) and Pela Vida Organization, from 1983-2007. To inclusion in the study, it was necessary reduced ARSA activity and excluded ARSA pseudodeficiency. For patients who agreed participating in the study a clinical evaluation questionnaire was completed. **Results:** We identified 35 cases of LDM, with 29 (male: 16, mean age: 8.6 years) from 26 families, who agreed to participate. Among the patients included, only one died at the time of the study. The rate of parental consanguinity was 38.4%. None of the patients included had performed bone marrow transplantation. The origin of the patients, considering the Brazilian region of birth, was heterogeneous, but predominantly in the Southeast (51.7%). Of the 29 cases described, there was predominance of late infantile form, with 22 (75.8%) cases reported. Mean age at diagnosis of late infantile MLD patients was 39.05 months, on average 21.05 months after the onset of symptoms. In the juvenile form, the mean age at diagnosis was 161.25 months or 76.5 months on average after the onset of

symptoms. There was no statistically significant correlation ( $r=-0.09$ ,  $p=0.67$ ) between the levels of ARSA activity and age of onset of symptoms. Motor manifestations, especially those related to deambulation, showed predominance in the first symptoms of late infantile MLD patients (72.7%), and are also present in the juvenile form, but in similar proportion to cognitive/behavioral alterations (50%). In the late infantile form, 13/21 patients showed signs of diffuse demyelination on magnetic resonance imaging of brain, and none of the 21 cases showed demyelination alone or initial in fronto-temporal region or basal ganglia. Electroneuromyography showed alterations in almost all cases that underwent examination ( $n=12/13$ ). Among patients with ARSA reduced activity identified by LEIM/HCPA (and who did not have study inclusion), are the first Brazilian patients with multiple sulfatase deficiency and the Del22q13 syndrome described in the literature. **Discussion/Conclusions:** MLD shows wide geographical distribution in Brazil. The diagnosis delay of these patients, and difficulty in the establishment of differential diagnosis of ARSA deficiency, indicates that there is a lack of awareness of these diseases among health professionals and a lack of structure for the diagnosis, follow-up, and treatment of these patients in the country. The predominance of late infantile MLD in the sample may be indicative of underdiagnosis of the other clinical forms. The data also suggests that the presence of punctate calcifications should be considered a radiographic finding suggestive of LD, and that the Del22q13 syndrome needs to appear in the list of differential diagnosis of ARSA deficiency.

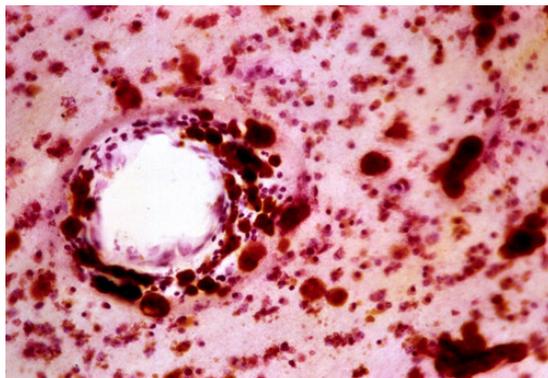
## 1. INTRODUÇÃO

A leucodistrofia metacromática (LDM) é um erro inato do metabolismo, do grupo das doenças lisossômicas (DL), de herança autossômica recessiva, causado pela atividade deficiente da enzima arilsulfatase A ou ARSA (Cerebrosídeo-sulfatase, EC 3.1.6.8) (Mabe-Santana, 2006). A atividade deficiente da ARSA é secundária, neste caso, à presença de mutações patogênicas em ambos os alelos do gene *ARSA*. A ARSA degrada uma série de lipídeos sulfatados (sulfogalactosilceramidas ou sulfatídeos), localizados principalmente em macrófagos microgliais e oligodendrócitos. O principal destes sulfatídeos é o cerebrosídeo-sulfato que, em conjunto com os demais, tem como principal função constituir a bainha de mielina de células nervosas centrais e periféricas. O acúmulo destes sulfatídeos é o responsável primário pelas manifestações patológicas da doença (von Figura *et al.*, 2001). Clinicamente, a LDM caracteriza-se fundamentalmente por alterações neurológicas, secundárias tanto a processos de dismielinização (formação inadequada da bainha de mielina), quanto de desmielinização (perda da mielina previamente formada), com predominância significativa da última.

### 1.1 Aspectos Históricos

Em 1910, Alzheimer descreveu um adulto com uma doença neurodegenerativa, cujas lâminas histológicas de córtex cerebral apresentavam metacromasia. O termo “metacromasia” designa o fenômeno em que certos corantes catiônicos mudam a sua coloração azulada para tons rosados ou amarronzados, quando ligados a certos grupamentos aniônicos presentes em diversos compostos orgânicos, como os sulfatídeos (Figura 1). Esta teria sido a primeira descrição clínica de um caso de LDM, mas não houve material armazenado adequadamente para a devida comprovação. Em 1925, Scholz descreveu três irmãos com leucodistrofia progressiva (em um trabalho clinicamente bem detalhado), mas não conseguiu testar a presença de metacromasia nas suas lâminas, pois havia tratado suas amostras com álcool,

removendo os lipídeos responsáveis pela metacromasia nessa condição. Contudo, Pfeiffer (1955), trabalhando com amostras congeladas destes três pacientes, conseguiu provar (através da coloração por ácido acético e violeta de cresil) a presença de metacromasia nos tecidos coletados por Scholz. Posteriormente, Austin (1958) e Jatzkewitz (1959), de forma independente, verificaram que a substância metacromática, que se acumulava na LDM, era um esfingolípido sulfatado (3-O-sulfogalactosilceramida). Em 1963, foi estabelecida a relação causal entre a LDM e a deficiência de ARSA (Austin *et al.*, 1963), sendo que 17 anos depois o gene *ARSA*, foi identificado e localizado no braço longo do cromossomo 22 (Geurts van Kessel *et al.*, 1980) e totalmente seqüenciado em 1989 por Stein e colaboradores.



**Figura 1.** Microscopia óptica de lâmina de tecido cerebral de indivíduo com LDM, corada com violeta de cresil. Os sulfatídeos dentro dos macrófagos estão ligados ao corante, apresentando cor amarronzada. Os macrófagos estão localizados ao redor do vaso sanguíneo e dispersos por todo parênquima cerebral (Retirado de [http://missinglink.ucsf.edu/lm/ids\\_104\\_Demyelination/Didactic/Leukodystrophies.htm](http://missinglink.ucsf.edu/lm/ids_104_Demyelination/Didactic/Leukodystrophies.htm)).

## 1.2 Epidemiologia

A LDM é uma doença pan-étnica, que apresenta incidência global estimada em 1/100.000 recém-nascidos vivos (von Figura *et al.*, 2001). Contudo, nos poucos trabalhos existentes sobre a freqüência dessa doença fica evidente a grande variabilidade da incidência. Valores como 1/40.000 nascidos-vivos encontrados no norte da Suécia (provavelmente acima do esperado, devido ao

isolamento extremo dos *clusters* estudados) (Gustavson *et al.*, 1971), se contrapõe a valores de 1/130.000 encontrados na França (Guibaud *et al.*, 1973) e 1/170.000 de uma série alemã (Heim *et al.*, 1997). Trabalhos em grupos populacionais restritos identificaram freqüências ainda mais elevadas, de até 1/75 entre judeus da região de Habban (sul do Iêmen) (Zlotogora *et al.*, 1980), 1/2.500 entre esquimós e 1/6.400 entre índios Navajo da América do Norte (Holve *et al.*, 2001).

De modo geral, estudos de prevalência de DL, como a LDM, são bastante escassos na literatura. Três grandes trabalhos, no entanto, foram realizados na Austrália (Meikle *et al.*, 1999), Holanda (Poorthuis *et al.*, 1999) e em Portugal (Pinto *et al.*, 2004), e encontraram uma prevalência de LDM de 1,09/100.000 nascidos-vivos, 1,42/100.000 nascidos-vivos e 1,85/100.000 nascidos-vivos, respectivamente (incluindo diagnósticos pré- e pós-natais). Em Portugal, a LDM representa 9% dos casos das DL diagnosticadas no país no período entre 1982 a 2001, sendo a quarta mais comum nesse grupo de doenças, estando atrás da mucopolissacaridose tipo II, gangliosidose GM2 e doença de Gaucher (Pinto *et al.*, 2004). Na Holanda, no período de 1970 a 1996 foram diagnosticados 963 casos de DL, dos quais a LDM representou 10,7% desse total, sendo o segundo diagnóstico mais freqüente nesse grupo de doenças (Poorthuis *et al.*, 1999). O estudo australiano (Meikle *et al.*, 1999) identificou a LDM como a quarta DL mais freqüente, representando 7,2% dos casos.

Não existe estudo brasileiro publicado na literatura que documente de forma mais detalhada a prevalência dessa doença no nosso país. Em 1997, Coelho e colaboradores descreveu que cerca de 59,8% dos EIM diagnosticados no Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (LEIM-SGM/HCPA) são DL, entre as quais a LDM é uma das mais freqüentes, juntamente com gangliosidose GM1, mucopolissacaridose tipo I e tipo VI (Rohrbach e Clarke, 2007). Algumas iniciativas recentes podem contribuir para isso, como a organização não-governamental (ONG) PELA VIDA, fundada em maio de 2002, apresenta entre seus objetivos principais informar a sociedade civil sobre doenças metabólicas (em especial, a LDM), viabilizar e facilitar seu diagnóstico, prestar assistência às famílias de pacientes afetados e criar parcerias

que incentivem a pesquisa de novas opções terapêuticas para esta doença. A parceria com o Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (SGM-HCPA), implementada a partir de 2004, vem facilitando o diagnóstico da LDM no Brasil, através de encaminhamentos de amostras de pacientes com esta suspeita clínica.

### **1.3 Aspectos Clínicos**

A LDM pode manifestar-se clinicamente em praticamente todas as idades. Apresentando-se de forma bastante heterogênea, a LDM pode ser classificada em três formas clínicas conforme a gravidade e idade de apresentação dos sintomas iniciais, a saber: infantil tardia, juvenil e adulta. A forma infantil tardia, que como o próprio nome diz tem suas manifestações iniciais na infância, é o tipo clínico mais freqüente e com o quadro mais uniforme, pois a variabilidade fenotípica é bastante intensa entre as formas adultas.

De forma geral, a LDM tende a cursar com a mesma forma clínica dentro de uma mesma família, mas variações intrafamiliares também já foram descritas (Arbour *et al.*, 2000). Isso sugere que outros fatores genéticos (ou epigenéticos) exerçam influência no curso clínico da doença. Essa heterogeneidade clínica, aliada à própria raridade da doença e à presença de heterogeneidade alélica, gera muitas dificuldades no estabelecimento de associações consistentes entre genótipos e fenótipos clínicos, já que é necessário um número razoável de indivíduos, com as mesmas mutações, para a realização desses estudos. Além disso, a ocorrência de variabilidade intrafamiliar gera uma dificuldade adicional na avaliação dos resultados de tratamentos como o transplante de medula óssea (TMO), quando se compara o curso da doença entre irmãos tratados e não-tratados (Gieselmann, 2007).

#### **1.3.1 Diagnósticos diferenciais**

A LDM apresenta manifestações iniciais, curso clínico, achados laboratoriais e de exames de imagem muito semelhantes aos de outras doenças neurodegenerativas, que cursam com leucodistrofia. Atraso no desenvolvimento

neuropsicomotor após período de desenvolvimento normal e perda de habilidades adquiridas são indicações obrigatórias para a realização de exame de imagem do sistema nervoso central, preferencialmente ressonância nuclear magnética (RNM). Uma vez que alterações de sinal em substância branca (leucodistrofia) são evidenciadas, é necessário considerar o diagnóstico de outras condições como: doença de Krabbe, adrenoleucodistrofia ligada ao X, doença de Pelizaeus-Merzbacher, doença de Alexander, fucosidose, doença de Canavan, gangliosidose GM1 e GM2 (Fluharty, 2008) (Quadro 1).

Embora algumas mucopolissacaridoses (MPS) possam ter uma apresentação semelhante, no que tange a regressão neurológica e atraso do desenvolvimento, as características físicas observadas na maioria dos pacientes com MPS (a saber, baixa estatura, disostose multiplex, face grosseira, opacificação corneana, hepatosplenomegalia e doença cardiopulmonar) não são encontrados em indivíduos com LDM.

**Quadro 1.** Leucodistrofia: principais erros inatos do metabolismo a serem considerados no diagnóstico diferencial.

<b>Erro Inato do Metabolismo</b>	<b>Enzima deficiente</b>	<b>Padrão de herança</b>
Doença de Krabbe	galactocerebrosidase	AR
Doença de Canavan	aspartoacilase	AR
Doença de Alexander	Proteína glial fibrilar ácida	AD
Distrofia neuroaxonal	fosfolipase A2 - grupo VI	AR
Doença de Pelizaeus-Merzbacher	Proteína proteolipídica-1	LX
Fucosidose	alfa-L-fucosidase	AR
Adrenoleucodistrofia ligada ao X	ATP cassete-ligadora subfamíliaD membro 1	LX
Gangliosidose GM1 e GM2 formas juvenis	beta-galactosidase	AR
Encefalopatias mitocondriais	a depender do defeito gênico associado	MT, AD, AR

AR: autossômica recessiva, AD: autossômica dominante, LX: ligada ao X. MT: mitocondrial

### 1.3.2 Formas clínicas da LDM

A LDM pode ser classificada em três subtipos clínicos, de acordo com a idade de aparecimento dos primeiros sinais e sintomas clínicos: forma infantil tardia com 50-60% dos casos, juvenil com aproximadamente 20%-30%, e adulta com cerca de aproximadamente 15% -20% (Fluharty, 2008).

*Forma Infantil Tardia.* Essa é a forma clínica mais freqüente, que pode se manifestar entre os 6 meses e os 4 anos de vida. Os sinais e sintomas iniciais, geralmente, ocorrem entre 12 e 24 meses de vida, em uma criança previamente hígida e com desenvolvimento neurológico normal, que conseguiu sentar sozinha e caminhou com apoio. O início da deambulação independente, muitas vezes, já apresenta algum atraso (van der Knaap e Valk, 2005).

As primeiras manifestações surgem com desequilíbrio de marcha (ataxia) e fraqueza muscular (hipotonia), evoluindo progressivamente para diminuição e perda dos reflexos tendinosos profundos (hipo- e arreflexia). Nos meses subseqüentes à apresentação inicial, a doença evolui inexoravelmente para comprometimento intelectual e cegueira (por atrofia do nervo óptico e nistagmo). A criança que se apresentava flácida e hipotônica, passa agora a tornar-se espástica, progredindo para uma quadriparesia espástica e limitação total ao leito (von Figura *et al.*, 2001)

Durante a evolução do quadro neurológico descrito, cerca de 25% dos pacientes apresentam crises convulsivas (em geral, de caráter generalizado) (MacFaul *et al.*, 1982, van der Knaap e Valk, 2005). O eletroencefalograma nesses pacientes, em geral, não apresenta alterações focais, e sim lentificação difusa de ondas nas fases mais tardias da doença (Baslev *et al.*, 1997). O quadro evolui para a perda total da capacidade de realização de qualquer atividade e contato com o meio, estimando-se uma sobrevida de 6 meses a 8 anos após o surgimento dos sintomas iniciais (Quadro 2).

*Forma juvenil.* Nesta forma clínica, a sintomatologia inicial ocorre entre os 4 e 15 anos de idade, em uma criança previamente hígida e mentalmente normal. Apresenta-se, inicialmente, com dificuldades escolares e alterações comportamentais (com condutas bizarras) e emocionais. Essas manifestações podem perdurar por meses e até mais de um ano, antes de qualquer outro sinal neurológico.

Os sintomas motores (alterações da marcha e tônus muscular) ocorrem subseqüentemente (Haltia *et al.*, 1980), mas em alguns casos podem ser também a manifestação inicial (Anlar *et al.*, 2006). Sintomas extrapiramidais podem acompanhar o quadro clínico, mas raramente são as manifestações principais da

doença. Crises convulsivas surgem ao longo da evolução da doença, ocorrendo de 30% a até metade dos casos com essa forma clínica, sendo geralmente do tipo parcial (Baslev *et al.*, 1997; van der Knaap e Valk, 2005). Sinais clínicos de neuropatia periférica desmielinizante nem sempre estão presentes, sendo notado no exame físico reflexos tendinosos profundos vivos (Bindu *et al.*, 2005).

Cabe ressaltar também que, na forma juvenil, toda a progressão da deterioração intelectual e motora da LDM é mais lenta, quando comparada com a forma infantil tardia, de modo que os pacientes podem sobreviver mais de dez anos após o início dos sintomas (von Figura *et al.*, 2001; MacFaul *et al.*, 1982) (Quadro 2).

*Forma adulta.* Esse é considerado o subtipo clínico mais raro (Seidel *et al.*, 1980). A idade de início dos sintomas apresenta uma variação muito grande, com descrições desde os 15 anos até os 60 anos de vida (Baumann *et al.*, 1991).

De forma geral, as alterações comportamentais e a deterioração cognitiva são os achados mais expressivos no começo do quadro, tanto que podem, muitas vezes, ser confundidos com déficit de atenção, esquizofrenia ou outras psicoses (Halsall *et al.*, 1999; Fukutani *et al.*, 1999).

O tempo livre de sintomas motores pode ser relativamente grande, aparecendo, então, transtornos de marcha, ataxia e sinais de neuropatia periférica (Baumann *et al.*, 2002). A neuropatia periférica é um aspecto freqüente da LDM forma adulta, sendo que neuropatia periférica isolada pode ser muitas vezes o sinal inicial (Felice *et al.*, 2000). No entanto, esse achado pode estar completamente ausente em alguns casos (Marcão *et al.*, 2005). Convulsões também podem ocorrer como nas outras formas clínicas, mas em uma freqüência mais baixa, sendo consideradas por alguns autores como um achado raro (van der Knaap e Valk, 2005).

Essa forma clínica é a que apresenta evolução progressiva mais lenta, excetuando raros casos com progressão rápida, os sintomas evoluem com piora progressiva por anos. O óbito dos pacientes ocorre aproximadamente 10 a 20 anos após as manifestações iniciais (Mabe-Santana, 2006) (Quadro 2).

**Quadro 2.** Formas da LDM: manifestações clínicas, diagnósticos diferenciais e exames laboratoriais (adaptado de Mabe-Santana, 2006)

<b>Achados</b>	<b>Forma infantil tardia</b>	<b>Forma juvenil</b>	<b>Forma adulta</b>
<i>Idade de inicio</i>	Entre 0 a 4 anos	Entre 4 e 15 anos	A partir dos 15 anos
<i>Principais manifestações clínicas</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Atraso nos marcos do desenvolvimento (marcha, fala...)</li> <li>- Quedas freqüentes e ataxia de marcha</li> <li>- Hipotonia</li> <li>- Reflexos tendinosos ausentes ou diminuídos</li> <li>- Atrofia óptica e nistagmo</li> <li>- Convulsões</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Alterações comportamentais</li> <li>- Dificuldades escolares</li> <li>- Ataxia e quedas freqüentes</li> <li>- Comprometimento extrapiramidal</li> <li>- Convulsões</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Alterações comportamentais (quadro psiquiátrico)</li> <li>- Demência progressiva</li> <li>- Ataxia</li> <li>- Convulsões</li> </ul>
<i>Sobrevida</i>	De 6 meses a 8 anos	De 10 a 20 anos	De 10 a 30 anos
<i>Principais diagnósticos diferenciais</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Doença de Krabbe</li> <li>- Encefalopatia mitocondrial</li> <li>- Doença de Canavan</li> <li>- Doença de Alexander</li> <li>- Distrofia neuroaxonal</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Adrenoleucodistrofia ligada ao X</li> <li>- Encefalopatia mitocondrial</li> <li>- Distrofia neuroaxonal</li> <li>- Doença de Krabbe juvenil</li> <li>- Gangliosidoses juvenis (GM1/GM2)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Psicose</li> <li>- Neuropatias com predomínio motor</li> <li>- Doença de Krabbe do adulto</li> <li>- Neuropatia, ataxia e retinite pigmentosa (NARP)</li> <li>- Adrenomieloneuropatia</li> </ul>
<i>Imagem do SNC (RNM ou TC)</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Alterações de substância branca periventricular e centro semioval</li> <li>- Fibras U poupadas</li> <li>- Início do pólo posterior em direção anterior</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Alterações de substância branca no centro semioval</li> <li>- Início do pólo anterior em direção posterior</li> </ul>	
<i>Líquido cefalorraquidiano</i>	Hiperproteinorraquia significativa	Hiperproteinorraquia ocasional	
<i>Estudos neurofisiológicos</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Diminuição da velocidade de condução (predomínio motor)</li> <li>- Alterações eventuais nos potenciais evocados</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Diminuição da velocidade de condução (predomínio motor)</li> </ul>	

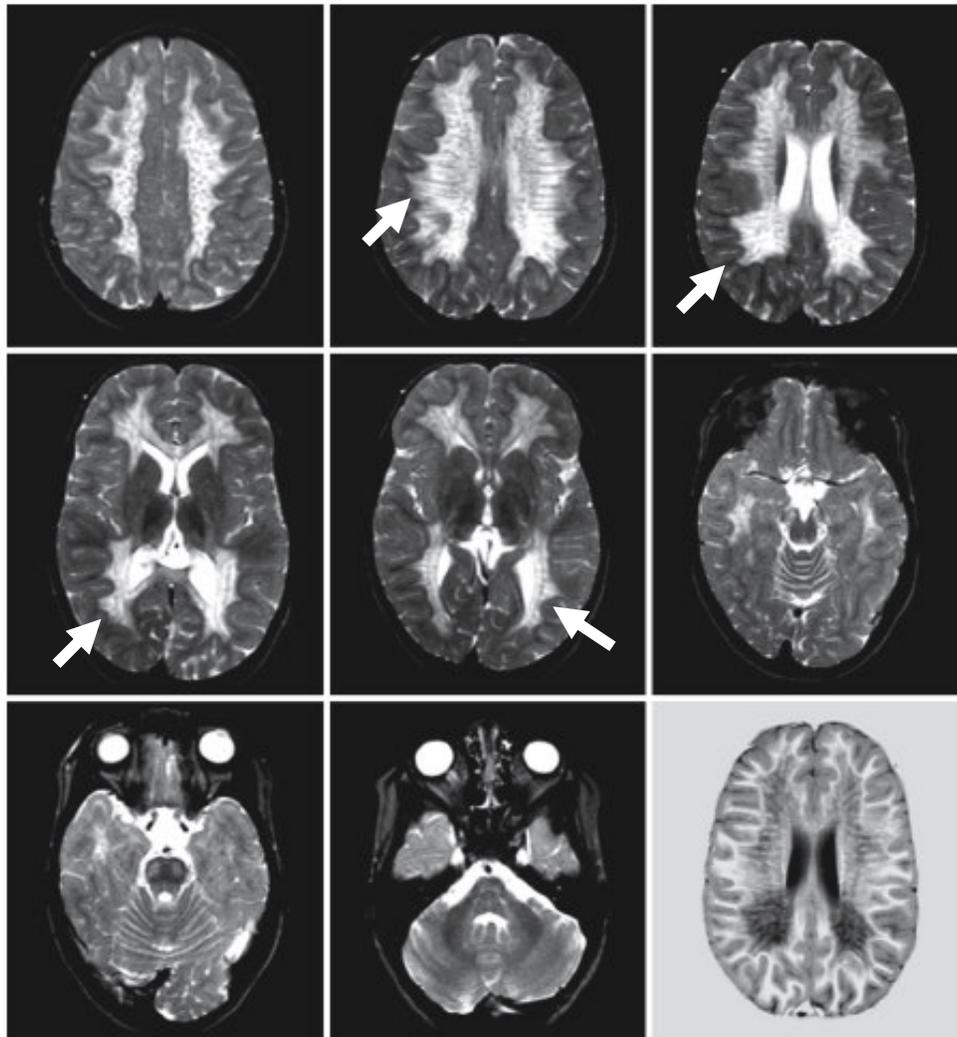
### 1.3.3 Exames complementares

Na investigação clínica da LDM, os exames de imagem, como tomografia computadorizada (TC) e ressonância nuclear magnética (RNM), são fundamentais e extremamente úteis para o diagnóstico; facilitando inclusive o do diagnóstico diferencial.

Os achados da TC na LDM mostram alterações simétricas com diminuição difusa da densidade da substância branca cerebral. De modo geral, a atrofia cerebral não é considerável, mas alguns pacientes com a variante adulta podem apresentar esse achado de forma mais proeminente (Shipper e Seidel, 1984). Hipodensidades na substância branca cerebelar também podem ocorrer, particularmente com a evolução da doença. Não há nenhuma intensificação de sinal com o uso de contrastes para realização da TC (van der Knaap e Valk, 2005).

A RNM, como a TC, também exibe alterações de substância branca (desmielinização) de forma simétrica e confluyente com intensificação de sinal em T2 (Figura 2). Acredita-se que as primeiras alterações ocorram em nível de corpo caloso, seguido de alterações nas áreas periventriculares e centro semioval (Faerber *et al.*, 1999). O comprometimento inicia-se nos lobos frontais com progressão Antero-posterior nas formas de início tardio, ao contrário das formas infantis, quando o comprometimento inicial se dá nos lobos occipitais, com progressão em direção anterior (van der Knaap e Valk, 2005). As fibras arqueadas são relativamente poupadas, mas pacientes com anos de evolução acabam por apresentar sinais de lesão também nessa topografia. Como na TC, não há intensificação de sinal com o uso de contrastes.

A substância branca tende a apresentar hipointensidades de sinal com padrão rajado característico da LDM na RNM, mas que também pode ocorrer na doença de Krabbe. Essas estriações quando vistas por microscopia correspondem a acúmulos de produtos da degradação da mielina no interior dos macrófagos perivasculares e bainhas de mielina ainda poupadas (van der Voorn *et al.*, 2004).



**Figura 2.** Ressonância nuclear magnética de um caso de LDM juvenil em uma menina de 6 anos de idade. A substância branca é difusamente envolvida, sendo poupadas as fibras U. Dentro das áreas afetadas é visto o padrão tigróide (rajado) (setas brancas).Corpo caloso, parte posterior da cápsula interna, tratos piramidais no tronco cerebral estão também comprometidos (Adaptado de van der Knaap e Valk, 2005).

Os achados de desmielinização vistos na RNM são também freqüentemente encontrados em outras entidades clínicas, como doença de Krabbe, adrenoleucodistrofia ligada ao X forma cerebral e doenças inflamatórias da substância branca (encefalomielite desmielinizante aguda), dificultando o diagnóstico diferencial baseado somente nos achados de imagem. Contudo, cabe ressaltar algumas diferenças como a presença de atrofia cerebral mais significativa na doença de Krabbe, quando comparada a LDM. Além disso, áreas

do tálamo, cápsula interna e corona radiata podem estar afetadas nessa condição, algo raramente observado na LDM. As doenças inflamatórias apresentam, geralmente, aumento de intensidade de sinal quando o exame é feito com o uso de contraste, além de o comprometimento ser mais assimétrico. Na adrenoleucodistrofia ligada ao X forma cerebral o comprometimento classicamente é no sentido postero-anterior, sendo os lobos occipitais inicialmente afetados, algo que é visto preponderantemente na variante infantil tardia (van der Knaap e Valk, 2005).

A espectroscopia de prótons por ressonância magnética na LDM mostra elevação nos níveis de colina dentro da substância branca anormal, o que está relacionado com o aumento do *turn over* das membranas celulares em função da desmielinização. O nível de N-acetilaspártato, relacionado à perda e dano axonal e neuronal, está diminuído tanto na substância branca (de forma mais significativa nas porções anormais) como na cinzenta, já os níveis de mioinositol estão elevados em função da alta taxa de gliose (Kruse *et al.*, 1993).

A LDM caracteriza-se por uma polineuropatia periférica na qual há redução da velocidade de condução nervosa, prolongamento do pico de latência e redução da amplitude dos potenciais de ação. Em estudo recente, foi visto que o comprometimento do sistema nervoso periférico é uma ferramenta muito útil na predição da gravidade do quadro clínico nos pacientes afetados. Esse achado está diretamente associado às formas mais precoces e graves da doença, não sendo encontrado na mesma frequência nas formas tardias e mais brandas da LDM (Biffi *et al.*, 2008). Dentro dos estudos eletrofisiológicos, também se podem encontrar alterações (ou mesmo ausência de resposta) nos potenciais evocados, sejam eles auditivos (PEA), visuais (PEV) ou somatossensitivos (PESS); a variabilidade é bastante grande, mas de forma geral o comprometimento é maior na forma infantil tardia (Gieselmann, 2007).

Outro achado laboratorial freqüentemente encontrado na LDM é a elevação dos níveis de proteína no líquido cefalorraquidiano, sendo achado freqüente na forma infantil tardia, mas raro nas formas adultas (Quadro 2).

## 1.4 Aspectos Bioquímicos

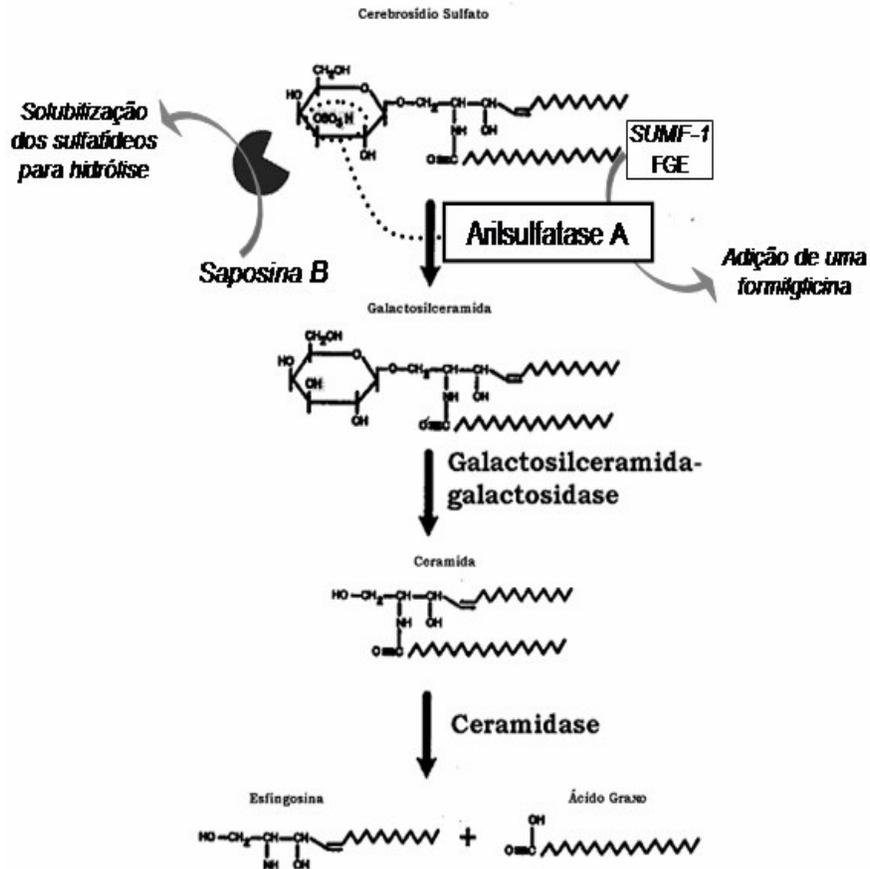
### 1.4.1 A enzima arilsulfatase A

A arilsulfatase A (ARSA) é uma glicoproteína ácida em função do alto conteúdo de ácidos aspártico e glutâmico e a grande quantidade de prolina (Laidler *et al.*, 1985). Esta enzima catalisa o primeiro estágio na rota de degradação do cerebrosideo sulfato, com a conversão a galactosilceramida e a liberação de sulfato (Figura 3). Ela é sintetizada no retículo endoplasmático rugoso, quando sofre uma conversão de uma cisteína (no sítio ativo) para C $\alpha$ -formilglicina, passando a formar uma estrutura dimérica. Essa modificação pós-traducional é realizada pela enzima SUMF1 (ou FGE, *formylglycine generating enzyme*), e é fundamental para que a ARSA seja cataliticamente ativa *in vivo*. Existem três potenciais sítios de glicosilação localizados nos resíduos de asparagina (N) nas posições 158, 184 e 350 da ARSA. A fosforilação dos resíduos de manose parece estar restrita às posições N-158 e N-350, mas quando não ocorre o processamento nesses sítios, o resíduo N-184 torna-se acessível a fosfotransferase, com conseqüente fosforilação da manose (Gieselmann *et al.*, 1994). Portanto, apesar de dois sítios, N-158 e N-350, serem responsáveis pela glicosilação *in vivo*, todos os três sítios são funcionais. Na ocorrência de uma alteração de DNA correspondente a algum destes sítios, os demais serão responsáveis pelo processo de glicosilação, garantindo a síntese e as propriedades catalíticas normais da enzima (Matzner e Gieselmann, 2005).

A ARSA é transportada para o complexo de Golgi onde se liga ao receptor de manose-6-fosfato (RM6P), na primeira e na terceira cadeia lateral. Esses RM6P medeiam o transporte de ARSA para o lisossomo, onde o pH ácido favorecerá a formação de octâmeros, que então possuem a capacidade de dessulfatação (Martino *et al.*, 2005). O equilíbrio dímero-octâmero é regulado por desprotonação-protonação da Glutamina 424. Diferente de muitas outras sulfatases, a ARSA não sofre processo protelítico posterior.

A ARSA não é capaz de degradar o sulfatídeo sozinha. É necessário que esse substrato esteja ligado a um pequeno ativador de proteínas, chamado saposina B (Figura 3). A saposina B não é específica para o sulfatídeo, nem para

ARSA; podendo ser encontrada agindo na degradação do globotriaosilceramida pela  $\alpha$ -galactosidase (Schuette *et al.*, 2001).



**Figura 3.** Rota de degradação de cerebrosídeo sulfato (adaptado de Pereira, 1994).

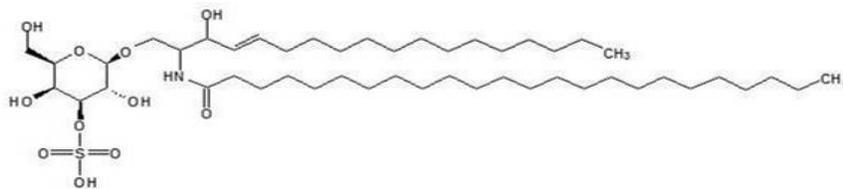
A ARSA já foi cristalografada e a sua estrutura tridimensional determinada, consistindo de uma folha-beta central com diversas alfa-hélices em ambos os lados (Lukatela *et al.*, 1998). Embora não haja homologia nas seqüências de aminoácidos, a estrutura tridimensional é bastante similar a da fosfatase alcalina bacteriana, refletindo a semelhança na clivagem hidrolítica de sulfatos e ligações fosfoéster.

#### 1.4.2 Os sulfatídeos

Os sulfatídeos estão presentes na membrana plasmática de diferentes tipos celulares, como epitélio respiratório, gástrico, dos túbulos renais distais e

ductos biliares. No entanto, a maior parte desse material encontra-se no sistema nervoso, onde são importantes componentes da bainha miélica, correspondendo de 4 a 6% do total dos lipídeos miélicos (Eckardt, 2008). Localizados especialmente na superfície dessa membrana, estão provavelmente ligados à proteína básica de mielina (BMP) por fortes interações iônicas (Arvanitis *et al.*, 1992). A análise bioquímica da substância branca normal tem uma proporção cerebrosídeo/sulfatídeo próxima de 4:1, mas na LDM essa relação decresce para menos de 1:1, revelando o grande acúmulo do último metabólito nessa condição (van der Knaap e Valk, 2005).

Os sulfatídeos (3-O-sulfogalactosilceramida, Figura 4) são formados através de duas etapas: primeiramente, um resíduo galactose é adicionado a ceramida no retículo endoplasmático, ocorrendo posteriormente a sulfatação da galactosilceramida (também chamada de galactocerebrosídeo) através de reação com 3'-fosfoadenosina-5'-fosfato (PAPS), no complexo de Golgi (Honke *et al.*, 2002). Sua degradação envolve a dessulfatação pela ARSA, que é a primeira etapa na degradação de 3-sulfogalactosil-glicolípideos (Bosio *et al.*, 1996). Como dito anteriormente, essa última reação é dependente de saposina B (codificada pelo gene *PSAP*, localizado no cromossomo 10q22.1, MIM\*176801), que se complexa com os glicolípideos sulfatados, facilitando o acesso da ARSA aos grupamentos sulfato (Schuette *et al.*, 2001). Assim, pode haver atividade deficiente da ARSA em decorrência da presença de mutações no gene que codifica a saposina B (a deficiência de saposina B também apresenta herança autossômica recessiva).



**Figura 4.** Estrutura química do sulfatídeo (ou 3-O-sulfogalactosilceramida)

Os sulfatídeos estão envolvidos em diversas funções celulares: (1) organização das junções axogliais paranodais; (2) localização adequada dos canais de sódio e potássio (Na/K-ATPase) na membrana dos axônios; (3)

diferenciação de oligodendrócitos; (4) ligação do GABA, opióides e serotonina com os seus respectivos receptores; (5) modulação da atividade de diversas enzimas importantes para o sistema nervoso central (SNC) (como fosfolipase A2, fosfodiesterase nucleotídeo-cíclica calmodulina-dependente e fosfatidilinositol fosfato 3-quinase) (von Figura *et al.*, 2001). Mais recentemente surgiram evidências do envolvimento do excesso de sulfatídeos no desencadeamento de processo de apoptose celular, por meio da despolarização da membrana mitocondrial e por translocação fosfatidil-serina (Zeng *et al.*, 2008).

### **1.4.3 Outras condições que também provocam atividade deficiente da ARSA**

#### **1.4.3.1 Deficiência de saposina B (Leucodistrofia Metacromática devido à deficiência do ativador de cerebrosídeo sulfatase)**

Shapiro *et al.* em 1979 e Hahn *et al.* em 1982 publicaram o relato de três pacientes de duas famílias com quadro clínico de LDM e atividade normal de ARSA. Em 1981, Stevens *et al.* também descreveu dois irmãos filhos de um casal consanguíneo que apresentam essa forma de LDM. Em 1984, Inui e Wenger demonstraram através de anticorpos monoclonais a ausência do ativador de proteínas (saposina B) nessa situação e que o metabolismo dos sulfatídeos poderia ser corrigido na cultura de células dos pacientes de Shapiro *et al.* por meio da adição do ativador.

As manifestações clínicas da deficiência de saposina B (MIM #249900), condição causada por mutações no gene *PSAP*, são similares às encontradas na LDM juvenil e adulta, causada pela deficiência de ARSA. No entanto, esses pacientes apresentam valores no limite inferior da normalidade (subnormais) de ARSA em leucócitos e plasma nos ensaios *in vitro*, e valores normais em cultura de fibroblastos. A degradação de sulfatídeos está marcadamente diminuída, gerando acúmulo em diversos tecidos e excreção urinária elevada desse metabólito, já que a ARSA não possui atividade catalítica *in vivo* sobre o sulfatídeo quando este não se encontra complexado à saposina B (Sandhoff *et al.*, 2001).

O diagnóstico definitivo de deficiência de saposina B se dá através da análise conjunta dos testes bioquímicos (dosagem de ARSA e cromatografia de sulfatídeos), e pode ter sua comprovação definitiva por meio da genotipagem do gene *PSAP*. Não existem tratamentos específicos para essa condição, sendo oferecidas apenas medidas de suporte para suas complicações clínicas.

#### **1.4.3.2 Deficiência de SUMF1 (Deficiência Múltipla de Sulfatases)**

As sulfatases eucarióticas, para que sejam cataliticamente ativas, necessitam a conversão de uma cisteína predita no cDNA em um resíduo de formilglicina (Schmidt *et al.*, 1995). Na ARSA, a cisteína 69 (Cys69) é convertida em formilglicina pela oxidação do grupamento tiol em aldeído, tornado-a biologicamente ativa (Dierks *et al.*, 1997). Essa modificação pós-traducional é direcionada pela seqüência de dezesseis aminoácidos que circunda a Cys69 e realizada pela FGE (EC 1.8.99.-), codificada pelo gene *SUMF1*.

Mutações no gene *SUMF1* (e a conseqüente inatividade da FGE) fazem com que todas as sulfatases tornem-se inativas, causando a doença denominada Deficiência Múltipla de Sulfatases (DMS, MIM #272200). A DMS é uma DL rara, com herança autossômica recessiva, na qual todas as sulfatases conhecidas apresentam atividade deficiente, resultando no acúmulo de mucopolissacarídeos ácidos e lipídeos sulfatados (Burk *et al.*, 1981; Burk *et al.*, 1984). Extremamente rara, tem sua prevalência estimada em <1 caso em 1 milhão de nascimentos (Meikle *et al.*, 1999). O gene *SUMF1* (MIM \*607939) envolvido na etiologia da DMS está situado no cromossomo 3p26.2, já tendo sido descritas cerca de 30 mutações, na sua grande maioria do tipo *missense/nonsense* (Díaz-Font *et al.*, 2005). A DMS combina características fenotípicas (manifestações clínicas e bioquímicas) de diferentes doenças causadas pela deficiência isolada de sulfatases: hepatoesplenoomegalia, retardo neuropsicomotor, ictiose, face grosseira e alterações esqueléticas (Yis *et al.*, 2008). Existem 17 sulfatases humanas descritas, das quais oito estão relacionadas a doenças (Quadro 3).

### Quadro 3. Sulfatases humanas

(adaptado de Parenti *et al.*, 1997)

Sulfatases	Localização celular	Substrato	Clínica na deficiência	Manifestações clínicas principais
<b>Arilsulfatase A</b>	Lisossomos	Sulfatídeos	Leucodistrofia Metacromática	Regressão neurológica progressiva, polineuropatia sensitivo-motora axonal
<b>Arilsulfatase B</b>	Lisossomos	Dermatan sulfato	Mucopolissacaridose VI	Hipertrofia de adenóides, contraturas articulares, hepatoesplenomegalia
<b>Arilsulfatase C</b>	Microsossomos	Esteróides sulfatados	Ictiose ligada ao X	Pele seca e descamativa
<b>Arilsulfatase E</b>	Complexo de Golgi	Desconhecido	Condrodisplasia punctata	Déficit de crescimento e retardo mental
<b>Galactose-6S-sulfatase</b>	Lisossomos	Condroitin e queratan sulfato	Mucopolissacaridose IVA	Opacificação de córnea
<b>Iduronato-sulfatase</b>	Lisossomos	Dermatan e heparan sulfato	Mucopolissacaridose II	Retardo mental, opacificação de córneas, face grosseira e hepatoesplenomegalia
<b>Glicosamina-6-sulfatase</b>	Lisossomos	Heparan sulfato	Mucopolissacaridose IIID	Retardo mental, hepatoesplenomegalia
<b>Sulfamidase</b>	Lisossomos	Heparan sulfato	Mucopolissacaridose IIIA	Retardo mental, hepatoesplenomegalia
<b>Glicuronato-2-sulfatase</b>	Lisossomos(?)	Heparan sulfato(?)	Desconhecido	-
<b>Glicosamina-3-sulfatase</b>	Lisossomos(?)	Heparan sulfato(?)	Desconhecido	-
<b>Arilsulfatase D</b>	Retículo endoplasmático	Desconhecido	Desconhecido	-
<b>Arilsulfatase F</b>	Retículo endoplasmático	Desconhecido	Desconhecido	-
<b>Arilsulfatase G</b>	Retículo endoplasmático	Desconhecido	Desconhecido	-
<b>Arilsulfatase H</b>	Desconhecido	Desconhecido	Desconhecido	-
<b>Arilsulfatase I</b>	Retículo endoplasmático	Desconhecido	Desconhecido	-
<b>Arilsulfatase J</b>	Retículo endoplasmático	Desconhecido	Desconhecido	-
<b>Telethon sulfatase</b>	Desconhecido	Desconhecido	Desconhecido	-

A DMS é uma doença extremamente rara, com prevalência estimada em 1/1.400.000 nascimentos (Meikle *et al.*, 1999), que ainda não possui tratamento específico disponível. Relatos de uso de reposição enzimática de arilsulfatase B humana recombinante e iduronato 2-sulfatase recombinante humana já foram publicados (Sandberg *et al.*, 2007), mas apesar dos resultados satisfatórios ainda não há nível de evidência científica suficiente para sua incorporação definitiva à prática clínica.

#### **1.4.3.3 Pseudodeficiência de ARSA**

Cerca de 2% da população em geral possui deficiência substancial de ARSA, com aproximadamente 10% da atividade catalítica normal da enzima (Shen *et al.*, 1993), mas não desenvolvem qualquer manifestação patológica associada à LDM, sugerindo que mesmo com essa redução, há o suficiente para manter o metabolismo normal. O termo pseudodeficiência não pode ser considerado adequado, pois conduz a uma impressão de deficiência apenas aparente, enquanto que na realidade trata-se de uma deficiência real (Gieselmann, 2007). A pseudodeficiência de ARSA (PD-ARSA) ocorre devido à homozigose de um alelo da arilsulfatase A, que se caracteriza por dois polimorfismos. O primeiro é uma transição de adenina (A) para guanina (G), responsável pela substituição de uma asparagina por uma serina no éxon 6 (N350S). Esse polimorfismo resulta na perda do sinal de um dos três sítios de N-glicosilação da enzima. O outro polimorfismo é resultado da perda do primeiro sinal de poliadenilação à jusante a partir do códon de parada (1524+95A>G), necessário para terminação adequada da síntese do mRNA (Gieselmann, 2007).

Cabe ressaltar que o alelo da pseudodeficiência se caracteriza pela presença obrigatória dos dois polimorfismos, mas alelos carregando estes de forma independente também já foram descritos, tanto para N350S, quanto para 1524+95A>G (Ott *et al.*, 1997; Gort *et al.*, 1999).

A literatura científica, de modo geral, usa o termo PD-ARSA para aquele com os dois polimorfismos anteriormente descritos, contudo qualquer alelo que expresse atividade de ARSA reduzida, mas metabolicamente suficiente, pode ser considerado PD-ARSA. Isso já foi descrito por Berger *et al.* (1999), A464V,

no qual atividade enzimática de ARSA está dentro dos valores de LDM, mas os indivíduos são clinicamente normais.

O estudo da PD-ARSA justifica-se não somente por motivos acadêmicos, mas também por ter implicações diretas no estabelecimento do diagnóstico de LDM e aconselhamento genético das famílias. É importante ter em mente que atividade deficiente de ARSA isoladamente, não é prova definitiva do diagnóstico de LDM (Quadro 4). Além disso, o alelo PD-ARSA é bastante freqüente na população em geral, não sendo incomum encontrá-lo entre pacientes com doença neurológica de causa desconhecida, cujo diagnóstico de LDM é bastante tentador quando do achado laboratorial de deficiência de ARSA. Em um estudo espanhol, a freqüência do alelo foi de 12,7% (com total de homozigotos de 2/55, 3,6%) (Chabás *et al.*, 1993). A estimativa da freqüência de portadores de mutações de PD-ARSA, em um estudo australiano que envolveu 73 indivíduos saudáveis amostrados foi de 20% (Nelson *et al.*, 1991). Em um estudo brasileiro com 171 indivíduos saudáveis e não-relacionados, foram identificados dois indivíduos homozigotos para a p.N350S e 1524+95A>G (correspondendo a uma freqüência de 1,17%, 4 de 342 alelos). A freqüência individual da mutação p.N350S foi 20,7% (71/342 alelos) e da mutação 1524+95A>G foi de 7,9% (27/342 alelos) (Pedron *et al.*, 1999).

A PD-ARSA não pode ser diferenciada da doença causadora de deficiência utilizando-se apenas ensaios enzimáticos de rotina com substratos artificiais. Enzimaticamente a distinção somente é possível através da utilização de substrato natural marcado radioativamente (Rafi *et al.*, 2003), que não é comercialmente disponível e tem uso restrito a pouquíssimos centros. Cabe ressaltar, que a detecção molecular dos polimorfismos descritos não exclui a presença simultânea de mutações no mesmo alelo, portanto não sendo possível excluir o diagnóstico de LDM definitivamente. Para isso, se faz necessária a realização de cromatografia urinária de sulfatídeos, que na ausência da excreção desse metabólito, confirma o diagnóstico de PD-ARSA.

**Quadro 4.** Fenótipo clínico resultantes das diferentes combinações entre os alelos selvagens, de mutações de PD-ARSA e de mutações de LDM

Genótipo	Fenótipo bioquímico		Fenótipo clínico
	Atividade da ARSA	Cromatografia de sulfatídeos	
N / N	Normal	Normal	Normal
N / LDM	Normal	Normal	Normal
PD-ARSA / PD-ARSA	Diminuída	Normal	Normal
PD-ARSA / LDM	Diminuída	Normal	Normal
LDM / LDM	Diminuída	Alterada	Leucodistrofia metacromática

N: alelo selvagem, PD-ARSA: alelo de pseudodeficiência de arilsulfatase A, LDM: alelo de leucodistrofia metacromática.

### 1.5 Aspectos Genéticos

O gene *ARSA* (MIM\*607574), localizado no cromossomo 22q13.31-qter, possui um tamanho total de 3,2 kb e é formado por oito éxons, que variam de 103 a 320 nucleotídeos. Existem três potenciais sítios de glicosilação, dois localizados no éxon 3 e um no éxon 6 (Gieselmann *et al.*, 1989). A região promotora corresponde a aproximadamente 400 pares de base à montante do códon de iniciação, com posições típicas (*GC boxes*) para interação com o fator de transcrição *Sp1* (von Figura *et al.*, 2001). O isolamento do cDNA de *ARSA* foi obtido em 1989 a partir da proteína purificada por Waheed e colaboradores (1982), contendo 1521 pares de bases (correspondendo a um transcrito de 2,1kb) e codificando uma proteína de 507 aminoácidos (Stein *et al.*, 1989). A proteína contém um peptídeo sinalizador com 18 resíduos de aminoácidos, os quais são removidos no transporte até o retículo endoplasmático (RE).

Até o momento, cerca de 120 mutações diferentes foram descritas no gene *ARSA*, sendo a grande maioria delas privadas (HGMD, 2009). Em virtude disso, o diagnóstico molecular em geral é de pouca relevância na prática clínica. Contudo pode ser útil em algumas situações específicas no aconselhamento genético, como na determinação do estado de portador

(heterozigoto), na qual a dosagem da atividade enzimática da ARSA não é confiável (Gieselmann, 2007). Configura-se desse modo, que a melhor estratégia de investigação da LDM inicia-se com estabelecimento do diagnóstico bioquímico, e a partir de então a pesquisa das mutações mais comuns (por meio de PCR e enzimas de restrição). No caso, de se obter resultados negativos (isto é, ausência de mutações comuns) parte-se para o seqüenciamento de todo o gene. Uma vez determinada as mutações do probando, a análise direta pode ser realizada nos demais familiares.

Dentre esse grande número de mutações já descritas, apenas três podem ser consideradas freqüentes (Lugowska *et al.*, 2002). A primeira é uma troca de bases (uma adenina por uma guanina) na junção éxon/íntron localizado no íntron 2 (c.459+1G>A). A segunda é uma mutação de sentido trocado (*missense*), na qual há uma transição de citosina para timina, gerando uma troca de aminoácidos (uma prolina por leucina), p.P426L no éxon 8 (Polten *et al.*, 1991). A terceira também é uma mutação do tipo *missense*, na qual há troca de uma isoleucina por uma serina, p.I179S. A freqüência relativa dessas mutações já foi determinada em diversas populações, variando entre 14 a 43% para c.459+1G>A, cerca de 25% para p.P426L e 11% para p.I179S (Berger *et al.*, 1997; Polten *et al.*, 1991; Regis *et al.*, 1996). A mutação c.G1238A é comum entre a população portuguesa (Marcão *et al.*, 1999), enquanto que a mutação p.D255H é descrita em aproximadamente 20% de uma amostra da população espanhola (Gort *et al.*, 1999). A mutação p.G99D representa cerca de 30% do total de mutações entre pacientes japoneses diagnosticados com LDM (von Figura *et al.*, 2001).

Embora, exista grande variabilidade clínica mesmo quando consideramos pacientes com o mesmo genótipo, foi proposta por Polten *et al.* (1991) uma correlação genótipo-fenótipo simples, baseada no tipo de alelo presente. Quando da presença da mutação c.459+1G>A considera-se o alelo como nulo (0), já que inexistente atividade catalítica da ARSA. A mutação p.426L não permite que a ARSA forme octâmeros, permanecendo a mesma na forma de dímeros que são rapidamente degradados pela catepsina L. Desse modo, a mutação reduz de forma significativa o tempo de meia-vida da proteína, mas como certo percentual da enzima é ativo, alguma atividade catalítica residual persiste. Alelos com mutações p.P426L e p.I179S que possuem alguma

atividade residual, são denominados residuais (R). É esperado que pacientes homocigotos para alelos 0, desenvolvam a forma infantil tardia; heterocigotos (0/R), a forma juvenil e homocigotos para o alelo R, a forma adulta (Fluharty, 2008).

Outro achado é a associação do tipo de manifestação inicial na LDM forma adulta e o tipo de mutação. Pacientes portadores da mutação p.P426L tendem a apresentar inicialmente sintomas neurológicos, enquanto que portadores da mutação p.I179S manifestam inicialmente sintomas psiquiátricos (Rauschka *et al.*, 2006). Apesar da relativa frequência de p.I179S (cerca de 11% em populações caucasóides), até hoje nunca foi descrito um paciente LDM homocigoto para essa mutação, sugerindo que nessa situação o quadro clínico seja muito leve, as manifestações iniciais em idade mais avançada ou mesmo que o indivíduo seja completamente assintomático.

Ainda que algumas mutações possam ser relacionadas a determinados fenótipos mais comuns, nesse EIM não há claramente uma relação entre genótipo e fenótipo, podendo isso ser explicado secundariamente pela presença de mais de uma mutação do gene para a ARSA em um mesmo alelo ou que um *rol* de genes reguladores estaria influenciando a expressão final do fenótipo na LDM, gerando estas diferenças intrafamiliares e interfamiliares.

Até o presente momento, não existem estudos publicados sobre o gene ARSA em pacientes brasileiros com diagnóstico de LDM, não havendo dados disponíveis na literatura médica sobre a prevalência das principais mutações e estimativas de seu padrão de distribuição em nosso país.

## **1.6 Diagnóstico**

### **1.6.1 Diagnóstico bioquímico**

A ARSA está presente em diversos fluidos do organismo humano, como urina e sangue (von Figura *et al.*, 2001). Entretanto, para que a avaliação da atividade enzimática apresente um resultado confiável, ou seja, que forneça um diagnóstico de certeza, é necessário avaliar a atividade da ARSA em leucócitos ou em fibroblastos cultivados (de biópsia de pele).

O ensaio enzimático da ARSA pode ser realizado utilizando-se métodos colorimétricos, com uso do substrato 4-nitrocatecol sulfato (NCS) ou

fluorimétrico, com uso do substrato metilumbeliferil. É importante que durante o ensaio enzimático a atividade de outra sulfatase (arilsulfatase B, ARSB) seja inibida, já que essa enzima também cliva esses substratos. A inibição da ARSB pode ser feita através da adição de cloreto de sódio e pirofosfato de sódio em concentrações elevadas (Baum *et al.*, 1959) ou por meio de uma incubação prolongada a 0°C (Lee-Vaupel e Conzelmann, 1987).

Quando a atividade da ARSA é baixa, podemos estar diante de três situações distintas: a) paciente afetado por LDM; b) paciente afetado por DMS; c) indivíduo portador de PD-ARSA (situação não patológica).

Diante dessas possibilidades (Quadro 5), a avaliação deve prosseguir com exames complementares, que são fundamentais para a determinação precisa do diagnóstico. A investigação deverá incluir:

(a) ensaio enzimático da ARSB ou de outra sulfatase: para exclusão do diagnóstico de deficiência múltipla de sulfatases;

(b) cromatografia de sulfatídeos: para excluir a possibilidade de um caso de pseudodeficiência de ARSA e identificar casos de deficiência de saposina B. Na primeira situação a atividade de ARSA é baixa, mas não há presença de bandas de sulfatídeos na cromatografia urinária, já na deficiência de saposina B a atividade de ARSA é normal *in vitro*, mas há excreção urinária de sulfatídeos. A confirmação de deficiência de saposina B pode ser realizada com a medida deste composto em fibroblastos cultivados a partir de uma biópsia de pele. Na LDM a determinação de sulfatídeos urinários é um método bioquímico adicional, pois indivíduos com deficiência de ARSA apresentam excreção de quantidades elevadas deste substrato na urina.

**Quadro 5.** Condições a serem consideradas no diagnóstico diferencial de deficiência de arilsulfatase A

Diagnóstico	Atividade de ARSA <i>in vitro</i>	Atividade de outras sulfatases	Excreção urinária	Manifestações clínicas principais
Deficiência múltipla de sulfatases	Muito reduzida	Reduzida	Sulfatídeos e mucopolissacarídeos	Leucodistrofia, hiperproteinorraquia, diminuição da velocidade de condução nervosa, face grosseira, disostose, ictiose
Deficiência de saposina B	Normal	Normal	Sulfatídeos e outros glicolipídeos	Quadro semelhante a LDM
Pseudodeficiência de ARSA	Reduzida	Normal	Normal	Assintomático
Leucodistrofia metacromática	Muito reduzida	Normal	Sulfatídeos	LDM

### 1.6.2 Diagnóstico genético

A análise genética molecular pode fornecer mais informações quanto às alterações do gene ARSA nos pacientes e em seus familiares. Como já discutido anteriormente, a genotipagem é também válida na investigação de PD-ARSA. O conhecimento do genótipo do probando pode ser particularmente útil para o diagnóstico pré-natal na família do mesmo, quando através de vilosidades coriônicas, amniócitos ou sangue do cordão umbilical pode se realizar tanto o ensaio enzimático da ARSA, como a determinação do genótipo (von Figura *et al.*, 2001).

### 1.6.3 Diagnóstico histopatológico

Com a maior disponibilização dos exames laboratoriais (tanto bioquímicos, como genéticos), a realização de biópsia de nervo periférico vem deixando de ser realizada para o estabelecimento do diagnóstico da LDM.

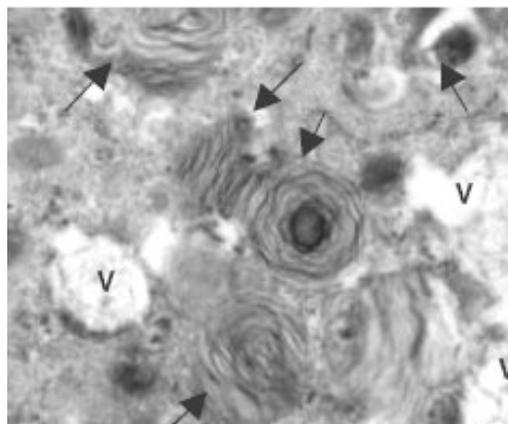
Histologicamente, a LDM caracteriza-se pela desmielinização do sistema nervoso (tanto central, quanto periférico) e pelo depósito de grânulos metacromáticos no tecido neural. Esses depósitos têm um diâmetro de 15 a 20 µm e secções de tecido exibem coloração amarronada quando coradas com solução acidificada de violeta de cresil a 1% (von Figura *et al.*, 2001).

A desmielinização inicialmente tende a ser desigual, mas após algum tempo de evolução da doença toda a substância branca passa a ser afetada de

forma simétrica. Esse processo ocorre, em especial, nos hemisférios cerebrais e particularmente no centro semi-oval, sendo mais intenso nas áreas periventriculares. O tronco cerebral também é afetado, mas de forma mais leve, assim como os hemisférios cerebelares que também podem estar comprometidos (van der Knaap e Valk, 2005).

Microscopicamente, visualiza-se a preservação dos axônios que somente têm sua densidade diminuída nas áreas mais afetadas pela doença. A proliferação de astrócitos é significativa, com conseqüente gliose fibrosa. Em geral, não são visualizados oligodendrócitos nas áreas afetadas, estando também em número bastante reduzido nas áreas preservadas. Infiltrado inflamatório é completamente ausente, mesmo em pequenas quantidades (van der Knaap e Valk, 2005).

Através da análise de alta resolução via microscopia eletrônica foi possível caracterizar os depósitos granulares, cujas inclusões são circundadas por uma membrana, exibindo natureza lisossômica e com morfologia que varia entre prismática ou lamelar (von Figura *et al.*, 2001) (Figura 5). Muito provavelmente, em decorrência das lesões descritas, astrogliose é um achado histológico freqüente na LDM. É interessante notar também que as fibras “U” são freqüentemente poupadas nesses pacientes, o que pode ser visto também através da ressonância nuclear magnética (von Figura *et al.*, 2001). O córtex cerebral permanece relativamente intacto, com perda mínima ou ausente de neurônios e nenhum acúmulo de material metacromático.



**Figura 5.** Fibroblastos de paciente com LDM mostrando inclusões e lisossomos de aspecto lamelar (setas) (Adaptado de Lagranha *et al.*, 2008)

A retina também apresenta acúmulo de grânulos metacromáticos com uma ultra-estrutura lamelar (Goebel *et al.*, 1992). O acúmulo de sulfatídeos também se faz presente em outras vísceras, particularmente quando compostas de tecidos com função excretora, como os rins em que há acúmulo de material metacromático em alças de Henle, túbulos contorcidos distais e túbulos coletores (von Figura *et al.*, 2001), sem acarretar repercussão clínica maior no paciente.

## 1.7 Tratamento

Atualmente, a LDM é uma doença sem tratamento curativo disponível. As limitadas opções terapêuticas disponíveis visam retardar o curso clínico da doença e oferecer medidas de suporte para melhoria da qualidade de vida desses pacientes. Alguns esquemas de tratamento dietético (com redução de vitamina A e enxofre, ambos necessários para a síntese de sulfatídeos) (van der Knaap e Valk, 2005) já foram testados, todos sem sucesso (Biffi *et al.*, 2008).

Uma das opções terapêuticas que se mostra mais promissora no tratamento de DL em geral, é o transplante alogênico de células hematopoiéticas (TACH). O racional dessa opção se baseia na idéia de que macrófagos e micróglia derivados do doador poderiam progressivamente estabilizar o nível de fornecimento de enzima endógena, agindo através de uma correção-cruzada, inclusive das células do SNC. Na LDM, o TACH tem como objetivo melhorar a evolução nos casos das formas juvenil e adulta (Krivit *et al.*, 1999) (Malm *et al.*, 1996). Isso porque já ficou provado que esse tratamento não funciona em crianças com a forma infantil tardia e nas formas juvenil e adulta, quando os pacientes já apresentam algum grau de comprometimento neuropsicológico e/ou sinal neurológico (Orchard *et al.*, 2007; Biffi *et al.*, 2008). A idéia de que pacientes com a forma infantil tardia (e ainda assintomáticos) também possam se beneficiar desse procedimento também nunca ficou comprovada, não havendo evidências científicas que embasem atualmente a realização do TACH nesses casos. Uma das justificativas para esse fato é a lenta substituição (estimada de 12 a 24 meses até a estabilização) da população residente de macrófagos e histiócitos por

células precursoras hematopoiéticas transplantadas, que assim não teriam tempo suficiente de conter a rápida progressão da doença. Nos pacientes transplantados se observou um aumento significativo na atividade da ARSA e diminuição dos níveis de sulfatídeos na urina, com um curso clínico da doença relativamente mais benigno. Existem esperanças de que o transplante de células do cordão umbilical nos primeiros meses de vida possa alterar positivamente a história natural da doença (Martin *et al.*, 2006; Martin *et al.*, 2007), mas mais ensaios clínicos serão necessários para a comprovar a eficácia.

Cabe ressaltar que até o momento cerca de 100 TACH foram realizados em pacientes com LDM, poucos sendo publicados, e quando isso ocorreu foram séries pequenas, muitas vezes relatando o mesmo paciente ou relato de um único caso, e com tempo de seguimento relativamente curto para avaliação de desfechos em uma doença crônica (Biffi *et al.*, 2008). Além disso, o simples aumento do tempo de sobrevida como benefício primário servindo de justificativa para a realização desse procedimento, não condiz com os objetivos dos pacientes e da suas famílias, que buscam essencialmente melhoria da qualidade de vida (Biffi *et al.*, 2008).

Nos pacientes em que o tratamento com TACH não é possível, em especial, naqueles em que a doença já se encontra em fase avançada, o objetivo central do manejo clínico deve ser focado na melhoria da qualidade de vida por meio de medidas gerais. O controle das crises convulsivas através do uso de anticonvulsivantes e o uso de relaxantes musculares com vistas à diminuição das contraturas musculares, são bons exemplos. Todas medidas devem ser utilizadas com vistas a maximizar as funções intelectuais e neuromusculares, através da otimização do aporte nutricional (inclusive com a decisão ou não do uso de gastrostomia), terapia física (fisioterapia motora e respiratória), manejo de complicações infecciosas e controle farmacológico das crises convulsivas (Balsev *et al.*, 1997). Outro cuidado a ser tomado nesses pacientes é o manejo anestésico, fundamental nos diferentes procedimentos diagnósticos e terapêuticos a que são submetidos (Mattioli *et al.*, 2007). É sempre importante que o tratamento desses pacientes ocorra dentro de uma equipe multidisciplinar, sendo oferecida uma rede de suporte à família, já que

mesmo os casos mais graves da forma infantil tardia podem ter uma evolução arrastada por mais de uma década.

Os resultados insatisfatórios das terapias propostas para LDM até o momento reforçam a necessidade de busca de novas opções terapêuticas. Sob a perspectiva de opções terapêuticas inovadoras encontra-se a terapia gênica (TG) (Sevin *et al.*, 2007). A TG tem por objetivo modificar geneticamente as células dos pacientes, para reverter o fenótipo patológico, sendo estudada para o tratamento de diversas doenças genéticas. O material genético pode ser transferido diretamente às células do paciente (terapia gênica *in vivo*) ou as células são removidas, modificadas por inserção do material genético e transplantadas de volta ao paciente (terapia gênica *ex vivo*) (Nardi *et al.*, 2002).

Em 2000, Matzner e colaboradores propuseram um protocolo de TG para tratamento da LDM no qual utilizaram um vetor retroviral para inserir o gene *ARSA* humano em células hematopoiéticas autólogas do modelo animal de LDM, que a seguir era submetido a um auto-transplante com as células modificadas. Uma das vantagens teóricas desse modelo é reduzir as dificuldades em se encontrar doadores compatíveis nos bancos de medula óssea, reduzindo o risco de rejeição e o tempo de espera. Os resultados finais não foram de todo animadores, já que apenas metade dos animais manteve os níveis sanguíneos de *ARSA* e os outros tiveram um rápido decréscimo ou passaram a níveis não detectáveis. Além desse estudo com TG, muitos outros estudos têm sido realizados com terapia celular (Biffi *et al.*, 2004; Kawabata *et al.*, 2006). A eficácia da TG no controle das manifestações da LDM, contudo, foi comprovada em outros ensaios pré-clínicos, utilizando vetores lentivirais que se mostram muito eficientes na transfecção de genes com mínima manipulação *in vitro* e perturbação celular (Matzner *et al.*, 2005; Biffi *et al.*, 2006). O ponto alto dessa opção de modificar células hematopoiéticas, em relação ao transplante tradicional, é que os níveis expressos de *ARSA* são muito superiores aos basais, produzindo efeitos preventivos e permitindo a correção das manifestações de LDM no modelo murino da doença, de forma superior ao procedimento clássico (Biffi *et al.*, 2006).

Com base nessas evidências, um ensaio clínico de terapia gênica de fase I/II está em fase final de revisão e aprovação, para a seleção de pacientes com LDM. O produto médico ("células CD34+ autólogas transfectadas com

vetor lentiviral contendo o cDNA humano da ARSA para o tratamento de LDM”) já foi concedido pela *European Commission for Orphan Drug Designation* (EMA/COMP 84536/2007).

Com relação à terapia de reposição enzimática (TRE), está em andamento um estudo clínico de fase I/II (realizado pela companhia biofarmacêutica escandinava Zymenex S/A), no qual pacientes europeus com a forma infantil tardia estão recebendo a enzima arilsulfatase A humana recombinante, rhARSA, cujo nome comercial é Metazym® (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT00418561). O estudo busca dados sobre segurança, eficácia e farmacocinética da medicação, mas resultados ainda não foram divulgados e ainda não existem publicações desse estudo.

Muitos desafios em relação à entrega da enzima recombinante ainda devem ser superados, quando a administração sistemática sustentada é necessária e quando o SNC e periférico são os alvos centrais da ação terapêutica, como no caso da LDM. De fato, a barreira hematoencefálica limita de forma drástica o acesso da medicação administrada de forma sistêmica, reduzindo o impacto terapêutico possível de ser obtido. Além disso, a administração de uma proteína exógena pode induzir uma resposta imune, através da formação de anticorpos não inibitórios que reduzem a capacidade de degradação dos sulfatídeos acumulados, algo já comprovado no modelo murino de LDM (Matzner *et al.*, 2008).

## **2. JUSTIFICATIVAS**

Inexistem grandes estudos clínicos descrevendo de forma detalhada a história natural da LDM, tanto na literatura nacional quanto internacional. Essas informações são agora essenciais para avaliação de novas opções terapêuticas, entendimento da evolução da LDM e a identificação de fatores prognósticos. Considerando a estimativa internacional para a prevalência das DL, deve estar havendo um subdiagnóstico da LDM no Brasil, além de uma provável confusão diagnóstica dessa doença com outras doenças neurológicas desmielinizantes que apresentam fenótipo clínico semelhante. Este estudo deverá gerar informações inéditas sobre o perfil epidemiológico, bioquímico e clínico da LDM no Brasil.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Delinear aspectos epidemiológicos, clínicos e bioquímicos da LDM em pacientes brasileiros, contribuindo para o melhor entendimento da história natural dessa doença.

#### **3.2 Objetivos específicos**

1. Caracterizar os aspectos epidemiológicos da LDM no Brasil;
2. Verificar a idade do diagnóstico dos pacientes com LDM;
3. Determinar a frequência relativa da forma clínica de LDM (infantil tardia, juvenil e adulta) apresentada por pacientes brasileiros;
4. Estudar a associação do fenótipo bioquímico com o fenótipo clínico na LDM nos pacientes estudados;
5. Identificar marcadores clínicos, que possam contribuir para prever o prognóstico e curso clínico da doença;
6. Contribuir para a caracterização de outras condições clínicas associadas à deficiência de arilsulfatase A, visando à ampliação do espectro de diagnósticos diferenciais desse achado laboratorial e a melhor caracterização fenotípica dessas condições.

#### **4. ARTIGO 1**

Clinical and biochemical study of 29 patients with metachromatic leukodystrophy

(Artigo a ser submetido ao periódico *American Journal of Medical Genetics*)

# Clinical and biochemical study of 29 Brazilian patients with metachromatic leukodystrophy

Oswaldo Artigalás<sup>1,2</sup>, Valeska Lizzi Lagranha<sup>2,3</sup>, Maria Luiza Saraiva Pereira<sup>1,4</sup>, Maira Graeff Burin<sup>1</sup>, Charles Lourenço Marques<sup>5</sup>, Hélio van der Linden<sup>6</sup>, Mara Lúcia Ferreira Santos<sup>7</sup>, Sergio Rosemberg<sup>8</sup>, Carlos Steiner<sup>9</sup>, Roberto Giugliani<sup>1,2</sup>, Ida Vanessa Schwartz<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup> Medical Genetics Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil

<sup>2</sup> Post-Graduation Program in Genetics and Molecular Biology, Department of Genetics, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

<sup>3</sup> Gene Therapy Center, Research Center, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil

<sup>4</sup> Biochemistry Department, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

<sup>5</sup> Department of Genetics, School of Medicine, USP, Ribeirão Preto, Brazil

<sup>6</sup> Center for Disability and Rehabilitation Dr. Henrique Santillo, Goiânia, Brazil

<sup>7</sup> Neurology Service, Pequeno Príncipe Hospital, Curitiba, Brazil

<sup>8</sup> Department of Pathology, School of Medicine, USP, São Paulo, Brazil

<sup>9</sup> Department of Medical Genetics, UNICAMP, Campinas, Brazil

**Running Title:** MLD in Brazil

**Key words:** metachromatic leucodystrophy, arylsulfatase A deficiency, lysosomal diseases, sulphatide accumulation, leucodystrophies

**\* Corresponding author:**

Ida Vanessa Doederlein Schwartz

Serviço de Genética Médica – Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Rua Ramiro Barcelos, 2350 – 90035-003 – Porto Alegre – RS – Brazil

Tel.: 55 51 21018011 Fax: 55 51 21018010

Email: [ida.ez@terra.com.br](mailto:ida.ez@terra.com.br)

## ABSTRACT

**Introduction:** Metachromatic leukodystrophy (MLD) is a rare autosomal recessive lysosomal storage disorder (LSD) in which the activity of arylsulfatase A (ARSA) is reduced, affecting primarily the nervous system. It is classified into three forms according to the age of onset of symptoms as follows: late infantile, juvenile, and adult form. **Aims/Methodology:** We present herein the data obtained from the study of a historical cohort of Brazilian patients with MLD; the study aimed at determining the epidemiological, clinical, and biochemical profile of MLD patients. Patients were identified through the registry of the Reference Laboratory for Inborn Errors of Metabolism located at the Medical Genetics Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil, which is a reference center for the diagnosis and management of LSD in the country. The inclusion criteria were deficient activity of ARSA, normal activity of another sulfatase, and the exclusion of an ARSA pseudodeficiency. Patients were evaluated by means of a clinical form which included epidemiological, clinical, and biochemical data filled out by the physician in charge or by one of the study researchers; completion was done via review of the patient's medical record and/or physical exam and/or interview with patients and their relatives. **Results:** Thirty-five Brazilian MLD patients were identified; 29 (male: 17) from 26 families agreed to participate in the study (late infantile form: 22; juvenile form: 4; adult form: 1; asymptomatic: 2) At the time of the study, 28/29 patients were alive. Consanguinity was reported by 38.4% of the families, and recurrence of the disease was reported by 30.7% families. Mean birth weight and length were, respectively, 3,176.4g  $\pm$  348.2 and 48.3cm  $\pm$  1.5. Mean ages at onset of symptoms and at biochemical diagnosis were, respectively, 19.05 months and 39.05 months for the late infantile form and 84.75 months and 161.25 months for the juvenile form. The most frequently reported first clinical symptom/sign of the disease was walking and other motor abnormalities (72.7%) for the late infantile form and behavioral and cognitive alterations (50%) for the juvenile form. Mean leukocyte ARSA activity was 0.67 $\pm$ 0.47 nmoles/h/mL; it did not have significant correlation with the age of onset of symptoms ( $r=-0.09$ ,  $p=0.67$ ). Considering the mean age at the last neurological evaluation for the late infantile form (40.7months  $\pm$  17.5,  $n=19/22$ ), pyramidalism (92.9%), loss of strength (92.3%), and ataxia (90.9%) were the most frequent abnormalities found, followed by dysphagia (64.3%). Abnormalities in white matter of the occipital region and basal nuclei only were not found in patients with the late infantile form of MLD. **Discussion/ Conclusions:** Our results suggest that there is a considerable delay between the age of onset of signs and symptoms and the diagnosis of MLD in Brazil. There does not seem to be a correlation between ARSA activity and the clinical form of MLD. Initial and/or isolated involvement of the basal nuclei and posterior white matter regions do not suggest the late infantile form of MLD. The availability of biochemical diagnostic tests and the provision of a better support to affected patients are urgently needed, as well as major clinical studies on MLD to broaden our knowledge about the natural history of this condition.

**KEY WORDS:** Clinical findings; Metachromatic leukodystrophy; Arylsulfatase A; Lysosomal Storage Disease; ARSA; MLD.

## INTRODUCTION

Metachromatic leukodystrophy (MLD; MIM 250100) is an autosomal recessive lysosomal storage disease (LSD), caused by the deficient activity of arylsulfatase A (ARSA; EC 3.1.6.8) or, more rarely, of its activator (saposin-B or Sap-B) (Von Figura et al, 2001). Partial deficiency of this enzyme is also found in a condition called pseudodeficiency (PD-ARSA) (Gieselmann et al, 1989), which has no clinical manifestations, and in patients with Multiple Sulfatase Deficiency. ARSA catalyzes the first step in the degradation of sulfatide (3-O-sulfogalactosylceramide), an essential component of myelin. Storage of sulfatide and other sulfated glycolipids leads to progressive demyelination of the central and peripheral nervous systems, making MLD a predominantly neurological disease. The *ARSA* gene (MIM\*607574) maps to chromosome 22q13, covers 3.2 kb of genomic DNA, and includes eight exons. So far, over 100 MLD-causing mutations have been identified in the *ARSA* gene, with the frequency differing among ethnic groups. Nevertheless, roughly 50% of the MLD alleles remain unidentified in routine analysis (Lugowska et al, 2005).

Epidemiological data are scarce but show that MLD is a rare disorder with an incidence of 0.06 in 10.000 live newborns (Hein et al., 1997). More recent reports estimated the birth prevalence of MLD to be 1.4–1.8 per 100,000 newborns for all types combined (Pinto et al, 2004; Poorthuis et al, 1999). MLD is classified in three clinical types according to the age of onset of clinical manifestations, as follows: late infantile (age of onset: 0-4 years), including about 50% of the diagnosed cases; juvenile (age of onset: 4-15 years), including about 20-30% of the diagnosed cases, and the adult form (age of onset: older than 15 years), including about 20-30% (Arbour et al, 2000). Studies on the natural history of this disease are also scarce in the literature and suggest that the clinical manifestations and disease progression vary among the different forms. Late infantile and early juvenile cases would have the more severe phenotype, which would be characterized by psychomotor regression, ataxia, progressive spastic quadriparesis, dysphagia, blindness, as well as deafness, seizures, diffuse muscular atrophy and weakness with

areflexia (Biffi et al, 2008b). In the adult form of MLD, the behavioral alterations and the cognitive deterioration may be the most significant findings in the beginning of the clinical picture, leading to misdiagnoses of attention deficit disorder, schizophrenia or other psychosis (Halsall et al, 1999; Fukutani et al, 1999).

The perspective of the availability of a specific treatment for MLD is imminent. Gene therapy and enzyme replacement therapy (ERT) in animal model of MLD have shown very encouraging results (Biffi et al, 2006) including positive effects on the central nervous system (Matzner et al, 2009). A clinical trial with ERT is presently in progress and may lead to a specific treatment in a near future. At this moment, treatment options for this condition are still quite restricted and limited to the support management of the disease's complications as well as the indication of bone marrow transplantation (BMT), which has limited indications (Biffi et al, 2008b).

The overall purpose of this study was to provide an overview of the clinical, and biochemical profile of a sample of MLD patients from Brazil, in order to contribute to the better characterization the natural history of this disorder.

## **PATIENTS AND METHODS**

The ethical and methodological aspects of this study were approved by the Research Ethics Committee of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). The sample was identified via the review of registries of the Laboratory of Inborn Errors of Metabolism of the Medical Genetics Service, HCPA, Brazil (LIEM-HCPA). The LIEM-HCPA is a reference center in the country for the diagnosis and management of inborn metabolic disorders, especially LSD, and has worked since 2003 in a partnership with the Brazilian parent association for leukodystrophies (known as Organization "Pela Vida – For Life"). It is estimated that the vast majority of Brazilian cases of MLD have been diagnosed at the LIEM-HCPA.

All patients diagnosed with deficiency of ARSA between 1983 and 2007 at LIEM-HCPA (herein called “possible MLD cases”), had their registries reviewed from a biochemical standpoint. Only those patients who presented low levels of ARSA activity in leukocytes and/or fibroblasts AND normal levels of other sulfatase as well as the exclusion of PD-ARSA were considered confirmed cases of MLD. PD-ARSA was excluded when the patient showed the following: (1) presence of sulfatides in urine, OR (2) absence of the mutations of the *ARSA* gene associated with PD-ARSA (p.N350S and c.1524+95A>G), OR (3) presence of anatomopathological findings suggestive of MLD, such as the presence of metachromatic inclusions in the optical microscopy of the nerve. Patients were classified into the three clinical MLD forms, according to the age of onset of symptomatology: late infantile form, onset of symptoms from 0 to 4 years; juvenile form, between 4 and 15 years; adult form, after 15 years of age (Arbour et al, 2000).

The physicians in charge of the patients were contacted, and received an informed consent form. For the patients/relatives who agreed to participate in the study, a clinical assessment form was completed; the forms were devised especially for this study based on the medical record review and/or physical exam of the patient and/or interview with patient/relative. Whenever possible, one of the study researchers (OA) collected personally the data of the cases. When this was not possible, the data collection was done by the assistant physician. The results of imaging and neurophysiology studies and/or the reports signed by the radiologist or neurophysiologist were considered for analysis. When there were serial evaluations of the same parameter, the results of the most recent evaluation were considered.

Only variables for which information was available for more than 50% of patients were analyzed. For patients who were deceased at the time of the study, information on the last physical examination recorded in the medical history was considered. The data was analyzed using SPSS 16.0. When values without a distribution close to the normal curve were present, the description of

the variable from the median and the interquartile interval 25-75 (IQR) was used; in the remaining cases, mean and standard deviation were used. The level of significance adopted was 5% ( $p < 0.05$ ). Spearman correlation coefficient ( $r$ ) was used for the correlation analysis between two aleatory variables.

## RESULTS

In the period analyzed (1983-2007) the LIEM-HCPA identified 113 possible cases of MLD and, according to inclusion criteria, 35 (30.9%) were considered confirmed cases of MLD. Among the 113 possible cases, one case of Del22q13 syndrome and one case of multiple sulfatase deficiency were also identified; they have been reported, respectively, in other articles written by the group (Artigalás et al, 2009; Artigalás et al, 2009b). In the remaining cases ( $n=76$ ) the diagnosis of MLD was considered not conclusive.

Twenty-nine patients agreed to participate in the study. These patients came from the Southeast ( $n=15/29$ ), South ( $n=9/29$ ), Northeast ( $n=3/29$ ), Center-west ( $n=1/29$ ), and North ( $n=1/29$ ) regions of Brazil. Of the patients, 17 were male (58.6%). None of the patients had received BMT or were enrolled in any clinical trial for MLD at the moment of the study. Median age at inclusion was 60 months (IQR=51) for the late infantile form, and the median age at inclusion for the juvenile form was 227 months (IQR=94). A 24-year old patient with the adult form was also included. In total, 13 patients were below 5 years of age; 8 were 6–10 years of age; 5 were 11–20 years old, and 3 were 21 years of age or older at the moment of inclusion in the study. Regarding the age of onset of symptoms, in 22/27 (81.5%) patients was less than 4 years (late infantile form), in 4/27 (14.8%) was between 4 and 15 years (juvenile form), and in 1/27 (3.7%) was above 15 years (adult form). Two patients were still asymptomatic at the moment of the study (age=43 and 110 months, respectively). At the time of the study, one of the patients was deceased (died at the age of 6 years and 3 months due to bronchopneumonia).

Of the 26 families studied, 10 (38.4%) reported parental consanguinity, and 8 (30.7%) reported the occurrence of another case of MLD in the family. Mean birth weight was  $3,176.4 \pm 348.2$ g, and mean birth length at birth was  $48.3 \pm 1.5$ cm. 13/26 (50%) patients were born through caesarean section.

Median age at the onset of symptoms in patients with the late infantile form was 17.5 months (IQR=8.5), and the median age for the beginning of the metabolic investigation was 29 months (IQR=13); the median age for the biochemical confirmation of the diagnosis was 34 months (IQR=19.5). In the cases with the juvenile form of MLD, median age at the onset of symptoms was 85.5 (IQR=41.25); median age at the beginning of the biochemical laboratorial investigation was 116.5 months (IQR=200.75), and mean age at the establishment of the definitive diagnosis was 117.5 months (IQR=199.75). Mean time between the mean age at onset of symptoms and the diagnostic confirmation was  $21.05 \pm 16.43$  months for the late infantile form. The test for urinary sulfatide (thin-layer chromatography) was performed in 92.6%; as expected, all cases displayed sulfatide bands (positive results). Mean leukocyte ARSA activity at diagnosis was  $0.67 \pm 0.47$  nmoles/h/mL (normal reference values: 5-20). No significant correlation was found between leukocyte ARSA activity and the age of onset of symptoms ( $r=-0.09$ ,  $p=0.67$ ). In six cases (20.7%) nerve biopsy was performed and showed metachromatic inclusions and typical findings of MLD.

Among the 22 patients with the late infantile form, 72.7% had alteration in walking or frequent falls as early manifestations of the disease, followed by neuropsychomotor development delay (31.8%); behavioral alterations (4.5%) or cognitive deficit (4.5%) were uncommon. In the juvenile form, two of the four patients presented cognitive deficit as early manifestation; in one case, cognitive deficit was associated with walking alterations. Table 1 describes the mean age of acquisition and loss of motor development milestones.

The occurrence of seizures was described in 10/22 (45.5%) of the patients with the late infantile form, whose mean age at the first episode was

36.5±12.9 months. In the juvenile form, 3/4 patients presented seizures. Seventeen of the 22 patients (77.3%) with the late infantile form made continuous use of medication, among which the most frequent were anticonvulsants (n=10/22, 45.5%), muscular relaxants (n=4/22, 18.2%), and medications for gastroesophageal reflux (n=4/22, 18.2%). All patients classified as having the juvenile form made chronic use of some medication, be it anticonvulsants (n=2/4), muscular relaxants (n=1/4), or antipsychotics (n=1/4). In the juvenile form, 3 of the 4 patients underwent surgical procedures; of them, 2 underwent gastrostomy, and 1 underwent orthopedic correction. Of the patients with the late infantile form, 40% (n=8/22) reported having undergone surgeries, of which 62.5% (n=5/8) were gastrostomies and 25% (n=2/8) orthopedic surgeries, such as hip dysplasia correction and tendon stretching surgery. Around 60% (n=13/22) of the patients with the late infantile form performed ophthalmologic evaluation sometime in their lives; 10 cases were informed that the exam was normal, and in 2 cases optical nerve atrophy was present. In the 3 patients with the juvenile form evaluated by an ophthalmologist, no atrophy of the optical nerve was verified, nor was another significant ophthalmological alteration described.

At least one evaluation was performed by a neurologist in 17/29 (58.6%) of the patients (mean age=58 months ± 21.9). In the late infantile form, signs of rigidity were described in 9/21 cases (42.9%); pyramidalism, in 7/21 cases (33.3%), and behavioral and cognitive alterations, in 3/21 cases (14.3%). Of the 4 patients with the juvenile form, 3 had behavioral and cognitive alterations described; in 2, pyramidal signs, and in only 1, signs of rigidity. Table 2 details the neurological exam performed and considered in the analysis.

Of the 22 cases of the late infantile form of MLD, nuclear magnetic resonance of the brain was performed in 21. Thirteen of them (61.9%) showed a diffuse compromise of the white matter, and this finding was the most frequently found (CI 95%: 39-85%). The signs of localized demyelination found in 4 patients were located in the periventricular region (n=2/4), the

parietal-occipital region (n=1/4), or in the infratentorial or cerebellar regions (n=1/4). No case of isolated or initial demyelination in the frontal-temporal or basal nuclei regions was described. Only cerebral atrophy was described in 3 cases, and NMR was still normal in 1 of the patients. Of the 5 patients with the late forms of the disease (juvenile and adult), for four the description of the image exam of the central nervous system was available. All presented signs of demyelination located in the periventricular regions, and 2 also presented basal nuclei alterations. Diffuse demyelination, cerebral atrophy, or an exam with a normal result was not described for any of the cases.

Electroneuromyography (ENMG) was performed in 13 patients with the late infantile form of MLD; of these, only 1 (7.7%) presented a normal result; 3 (23.1%) had unspecific results with speed reduction of nervous conduction, and 9 (69.2%) received the diagnosis of bilateral demyelinating sensitive-motor polyneuropathy. Seven patients had never undergone any ENMG, and this information was unavailable for 2 patients. Only 2 patients had performed visual evoked potential (VEP) (1 normal and 1 altered bilaterally), and 4, auditive evoked potential (AEP) (2 normal and 2 altered bilaterally). The performance of ENMG was described for 3 of the 4 patients with the juvenile form of MLD; all the 3 cases indicated the presence of bilateral demyelinating sensitive-motor polyneuropathy. No valid information on AEP and VEP for 3 of 4 patients with juvenile MLD, and exam results of the only patient with available information (at the age of 8 years) were altered bilaterally.

The only patient with the adult form included in the sample (female patient) began with symptoms between the age of 17 and 18 years (exacerbation of sexuality, cognitive deterioration, and audio-visual hallucinations). At the age of 20 years, the EEG showed signs of little organized base rhythms with bilateral occipital irritative activity. At the age of 21 years, the patient did not have sphincter control and presented severe dementia. The MRI performed at the age of 23 showed a hypersignal in the periventricular, subcortical white matter as well as in the semioval centers. At the age of 24

years, the patient presented receptive aphasia, motor aphasia, spastic gait, significant generalized hypotonia, and frequent falls. The patient never performed VEP, AEP, and ophthalmological evaluations.

## **DISCUSSION**

The lack of clinical descriptions on MLD in the scientific literature makes the information obtained by the present study certainly relevant. Most of the studies available are case reports counting with a small sample, which do not allow for generalizations as to their conclusions nor the understanding of the evolution of MLD or the identification of prognostic factors.

The present sample was composed predominantly of patients from the southeast region of Brazil (51.7%), which was expected since this region concentrates around 45% of the Brazilian population. However, there were patients from all regions of the country, which characterizes the broad distribution of this disease and the national coverage of our reference center. The rate of parental consanguinity found (38.4%) was high when compared to the value expected for the Brazilian population (1.6%) (Liascovich et al, 2001). This high frequency of consanguinity is in accordance with the autosomal recessive pattern of inheritance of the disease as well as with the fact that MLD is a rare disease.

Regarding the clinical forms, most patients had the late infantile form, as expected. Nevertheless, the proportion of cases with the juvenile (13.8%) and adult (3.4%) forms was lower than expected (20-30% for each respectively) (Arbour et al, 2000). Although a reduced prevalence of the later onset forms in Brazil cannot be excluded, this proportion may reflect the underdiagnosis of the late forms, since the manifestations are less aggressive when compared to the infantile form, the clinical picture is in general atypical (with no motor alterations), and there is a predominance of psychiatric symptomatology.

Mean weight and mean height at birth were similar to that expected for the Brazilian population. The number of patients born through cesarean section

(44.8%) was above that which is reported for the Brazilian population (36.4%) (Gomes et al, 1999). This is probably an occasional finding, since other gestational risk indicators, such as weight and height at birth, were within the normal range, as mentioned above.

The hypothesis that there would be a correlation between the forms and the catalytic activity of ARSA in leukocytes and fibroblasts (so that the patients with the clinically more severe and with a faster progression – infantile - would have lower values when compared to the later-onset forms - juvenile and adult) was not supported by our data. This finding that may be the result of the reduced number of patients enrolled in the study or may be due to the fact that *in vitro* tests are not sensitive enough to inform about the enzyme activity *in vivo*.

Isolated or initial demyelination in the frontal-temporal or basal nuclei regions was not described for any of the cases of the late infantile form; therefore, it becomes evident that this type of topography in patients with leukodystrophy ranging from 0 to 4 years of age does not suggest the diagnosis of MLD. Cerebral atrophy was described in only 3 cases, and the MRI was normal in 1 of the patients. This brings up the need not to definitively exclude the diagnosis of MLD in patients with a clinical picture compatible with the disease and whose central nervous system image exams are (still) normal.

Despite the many early clinical manifestations, the confirmation of the diagnosis of MLD was usually obtained long time after the onset of symptoms. This delay in the establishment of the diagnosis is evident to any of the clinical forms of the disease. We consider that the delay in the diagnosis was mainly due to the structure of the public health system in Brazil, which is not set up appropriately for the diagnosis of rare diseases. Moreover, the lack of knowledge about MLD among health professionals should be also considered because of its rarity. A better organization of the health system including of the creation of regional reference centers may improve this situation, facilitating access both to the necessary diagnostic means and to specialists in metabolic

diseases. It should be highlighted that an early diagnosis would favor mainly the late forms of the disease (juvenile and adult), when BMT is indicated, at least while a specific enzyme or gene therapy is not available. The lack of comprehensive investigation carried out by appropriate specialists after following diagnosis is striking. This was well characterized by the reduced number of patients that performed VEP, AEP, ENMG, and ophthalmological evaluation.

The finding of high number of inconclusive cases by reviewing the registries of a national reference center for the diagnosis of LSD deserve some comments. Of the 113 cases with ARSA enzyme activity below reference values, only 35 received the diagnosis of MLD, confirmed by the inclusion criteria of the present study, which require the exclusion of other conditions with an identical laboratorial finding. This reflects the fact that a more comprehensive diagnostic protocol was established only recently at the reference center. This protocol, which now includes, besides the measurement of ASA activity, the test for the presence for urinary sulphatides and the measurement of another sulfatase – and if possible ASA-PD investigation, was not performed on the cases referred before 2003. In addition, even in some recent cases the available samples were not appropriate to complete the protocol, precluding a final conclusion.

The present study generated novel information on the clinical, epidemiological and biochemical profiles of MLD in Brazil as well as on the intricate network of relations between these three levels of analysis, contributing to the understanding of the natural history of a rare neurodegenerative disease that affects practically all age groups and that still counts with scarce clinical information available. Moreover, from the data obtained it will be possible to devise the most effective strategies for the diagnosis and management of Brazilian patients with MLD. Although this is the largest series of patients with a clinical description already published in the literature, studies with a higher number of patients will be needed to better understand the natural history of

MLD. This information is would be essential for the evaluation of the specific therapies for MLD (enzyme and/or gene therapy, for instance) which, hopefully, should become a reality in a near future.

### **ACKNOWLEDGMENTS**

The authors thank Dr. Louise Christini Seabra de Melo, Dr. Marta Regina Clivati, Dr. Emerson Santana Santos, Dr. Fernando Norio Arita, Dr. Carolina F. de Souza, Dr. Júlio Amaro de Saconeski, and Mrs. Cristiane Spolador Pátaro Domingos for their collaboration in this work. This study was conducted with the support of the FIPE/HCPA, CNPq/Brazil, Post-Graduation Program in Genetics and Molecular Biology (Department of Genetics, Universidade Federal do Rio Grande do Sul), and the NGO Pela Vida. The authors declare that they have no conflicting financial interests.

## REFERENCES

Artigalás O, Silva LR, Burin M, Pastores G, Zeng B, Macedo N, Schwartz IV (2009) Multiple Sulfatase Deficiency: a very rare disorder or an underdiagnosed condition? Submitted to Metabolic Brain Disease IN PRESS

Artigalás O, Paskulin G, Riegel M, Schwartz IV (2009b) 22q13 deletion syndrome (Phelan-McDermid syndrome): another disorder associated with arylsulfatase A deficiency. Submitted to Clinical Genetics IN PRESS

Arbour LT, Silver K, Hechtman P, Treacy EP, Coulter- Mackie MB (2000) Variable onset of metachromatic leukodystrophy in a Vietnamese family. *Pediatr Neurol* 23: 173–176.

Biffi A, Cesani M, Fumagalli F, Del Carro U, Baldoli C, Canale S, Gerevini S, Amadio S, Falautano M, Rovelli A, Comi G, Roncarolo MG, Sessa M (2008) Metachromatic leukodystrophy – mutation analysis provides further evidence of genotype-phenotype correlation. *Clin Genet* 74(4):349-57.

Biffi A, Lucchini G, Rovelli A, Sessa M (2008b) Metachromatic leukodystrophy: an overview of current and prospective treatments. *Bone Marrow Transplant* 42 Suppl 2:S2-6.

Biffi A, Capotondo A, Fasano S, del Carro U, Marchesini S, Azuma H, Malaguti MC, Amadio S, Brambilla R, Grompe M, Bordignon C, Quattrini A, Naldini L (2006) Gene therapy of metachromatic leukodystrophy reverses neurological damage and deficits in mice. *J Clin Invest* 116(11):3070-3082.

Clinicaltrials.gov(<http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00418561?term=Metachromatic+leukodystrophy&rank=5>). Accessed on February 13, 2009

Gieselmann V, Polten A, Kreysing J, von Figura K (1989). Arylsulfatase A pseudodeficiency: loss of polyadenylation signal and N-glycosylation site. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 9436–9440.

Gomes UA, Silva AA, Bettiol H, Barbieri MA (1999) Risk factors for the increasing caesarean section rate in Southeast Brazil: a comparison of two birth cohorts, 1978–1979 and 1994. *Int J Epidemiol* 28 (4): 687–694.

Fukutani Y, Noriki Y, Sasaki K, Isaki K, Kuriyama M, Kurosawa K, Ida H (1999) Adult-type metachromatic leukodystrophy with a compound heterozygote mutation showing character change and dementia. *Psychiatry Clin Neurosci* 53(3):425-428.

Halsall DJ, Halligan EP, Elsey TS, Cox TM (1999) Metachromatic leucodystrophy: a newly identified mutation in arylsulphatase A, D281Y, found as a compound heterozygote with I179L in an adult onset case. *Hum Mutat* 14(5):447.

Heim P, Claussen M, Hoffmann B, Conzelmann E, Gärtner J, Harzer K, Hunneman DH, Köhler W, Kurlemann G, Kohlschütter A (1997) Leukodystrophy incidence in Germany. *Am J Med Genet* 71(4):475-478.

Liascovich R, Rittler M, Castilla EE (2001) Consanguinity in South America: demographic aspects. *Hum Hered* 2001: 1151: 27–34.

Lugowska A, Amaral O, Berger J, Berna L, Bosshard NU, Chabas A, Fensom A, Gieselmann V, Gorovenko NG, Lissens W, Mansson JE, Marcao A, Michelakakis H, Bernheimer H, Ol'khovych NV, Regis S, Sinke R, Tyłki-Szymanska A, Czartoryska B (2005). Mutations c.45911G.A and p.P426L in the ARSA gene: prevalence in metachromatic leukodystrophy patients from European countries. *Mol Genet Metab* 86: 353–359.

Matzner U, Lüllmann-Rauch R, Stroobants S, Andersson C, Weigelt C, Eistrup C, Fogh J, D'Hooge R, Gieselmann V (2009). Enzyme Replacement Improves Ataxic Gait and Central Nervous System Histopathology in a Mouse Model of Metachromatic Leukodystrophy. *Mol Ther* Jan 27. [Epub ahead of print]

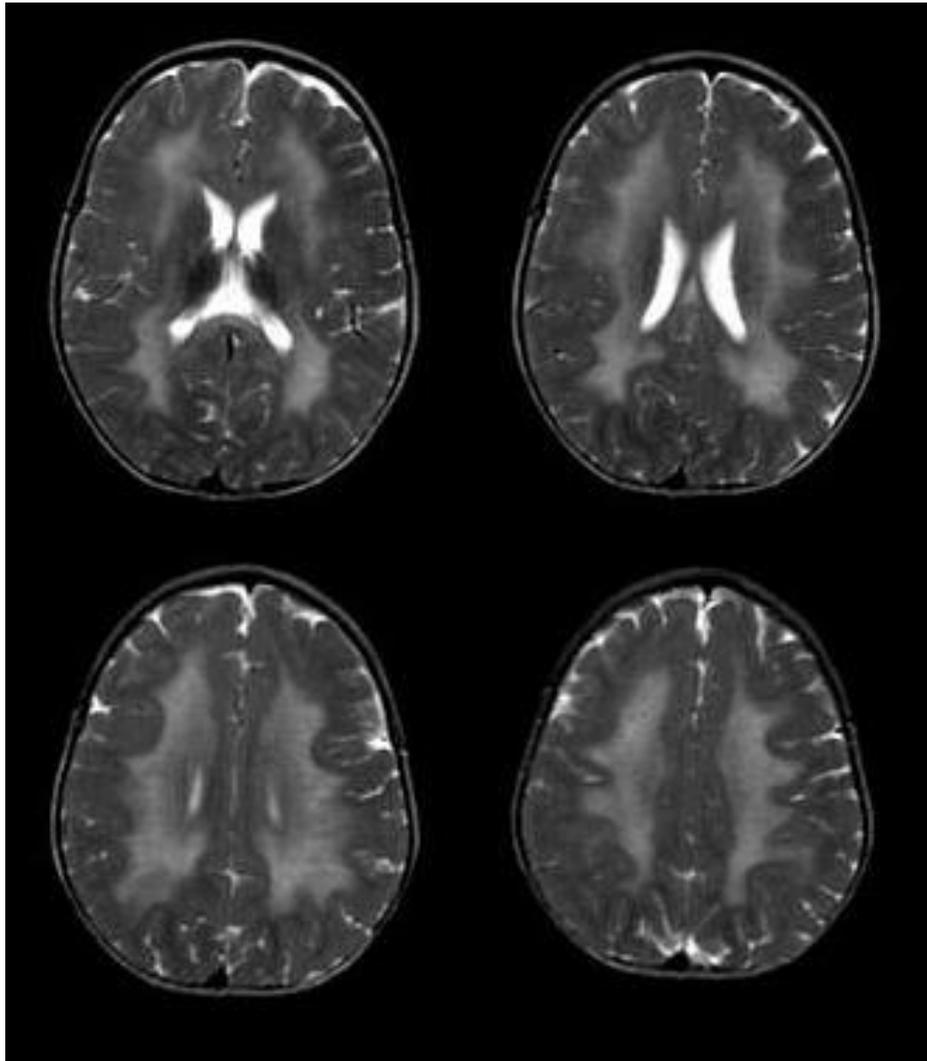
Pinto R, Caseiro C, Lemos M, Lopes L, Fontes A, Ribeiro H, Pinto E, Silva E, Rocha S, Marcão A, Ribeiro I, Lacerda L, Ribeiro G, Amaral O, Sá Miranda MC (2004). Prevalence of lysosomal storage diseases in Portugal. *Eur J Hum Genet* 12: 87–92.

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

Von Figura K, Gieselmann V, Jaeken J (2001) Methacromatic Leukodystrophy. In= Scriver CH, Beaudet A, Sly W, Valle D (orgs) *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease* (2001). Editora McGraw-Hill, pp 3695-3724.

**Figure 1**

T2-weighted brain MRI of a patient aged 3 years and 2 months with the late infantile form of metachromatic leukodystrophy presenting homogeneous and diffuse signal alteration of all white matter of the brain hemispheres, including the corpus callosum.



**Table 1**

Age of acquisition and loss of neuropsychomotor developmental milestones according to the clinical form of metachromatic leukodystrophy

Neuropsychomotor developmental milestone	Late infantile form (n=22)		Juvenile form (n=4)	
	Mean	Standard deviation	Mean	Standard deviation
Cephalic support - acquisition - loss	3.2 (n=21) 25.6 (n=8)	0.81 3.46	3.75 (n=4) 141.0 (n=2)	0.5 372.13
Sitting without support - acquisition - loss	7.68 (n=19) 27.0 (n=9)	1.65 10.88	7.0 (n=4) 129.0 (n=2)	1.15 55.15
Walking - acquisition - loss	14.4 (n=15) 26.0 (n=11)	3.42 9.82	13.25 (n=4) 108.0 (n=2)	1.26 33.94
Speaking two-syllable words - acquisition - loss	13.3 (n=15) 25.4 (n=10)	4.01 10.21	17.25 (n=4) 114.0 (n=2)	7.81 8.48

**Table 2**

Metachromatic Leukodystrophy: neurological findings at the last physical exam conducted

<b>Neurological Exam</b>		<b>Late infantile form</b> (n=15/22)	<b>Juvenile form</b> (n=2/4)
Mean age in months $\pm$ SD		40.7 $\pm$ 17.6	188 $\pm$ 54.1
Gait ataxia	Mild/moderate	4/11	1/2
	Severe	6/11	0/2
	Absent	1/11	1/2
Pyramidal signs	Mild/moderate	4/14	1/2
	Severe	9/14	0/2
	Absent	1/14	1/2
Dystonia	Mild/moderate	2/15	0/2
	Severe	1/15	0/2
	Absent	12/15	1/1
Rigidity	Mild/moderate	3/15	1/2
	Severe	4/15	1/2
	Absent	8/15	0/2
Nystagmus	Mild/moderate	2/13	0/2
	Severe	2/13	1/2
	Absent	9/13	1/2
Dysphagia	Mild/moderate	8/14	1/2
	Severe	1/14	1/2
	Absent	5/14	0/2
Dysarthria	Mild/moderate	3/14	1/2
	Severe	4/14	1/2
	Absent	7/14	0/2
Loss of strength	Mild/moderate	5/13	0/2
	Severe	7/13	0/2
	Absent	1/13	1/1
Loss of muscle Trophism	Mild/moderate	5/15	1/2
	Severe	7/15	0/2
	Absent	3/15	1/2

*The criteria of absent/mild/moderate/severe involvement were as judged by the physician in charge*

## **5. ARTIGO 2**

Del22q13 syndrome: another condition to be considered in the differential diagnosis of arylsulfatase A deficiency

(Artigo submetido ao periódico *Clinical Genetics*)



**Del22q13 syndrome: another condition to be considered in the differential diagnosis of arylsulfatase A deficiency**

Journal:	<i>Clinical Genetics</i>
Manuscript ID:	CGE-00108-2009
Manuscript Type:	Letter to the Editor
Date Submitted by the Author:	08-Mar-2009
Complete List of Authors:	Artigalas, Osvaldo; Hospital de Clinicas de Porto Alegre, Medical Genetics Service Schwartz, Ida; Hospital de Clinicas de Porto Alegre, Medical Genetics Service Riegel, Mariluce; University of Zürich, Institute of Medical Genetics Paskulin, Giorgio; Federal University of Health Sciences of Porto Alegre, Clinical Genetics Department
Key Words:	22q13 deletion, array-CGH, metachromatic leukodystrophy, Pseudodeficiency of arylsulphatase A



1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

Short title for running read:  
*Del22q13 syndrome and ARSA deficiency*

**22q13 deletion syndrome (Phelan-McDermid syndrome): another disorder associated with arylsulfatase A deficiency**

Oswaldo Artigalás<sup>1,2</sup>, Giorgio Paskulin<sup>3</sup>, Mariluce Riegel<sup>4</sup>, Ida Vanessa Schwartz<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup> Medical Genetics Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil

<sup>2</sup> Postgraduate Program in Genetics and Molecular Biology, Department of Genetics, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil

<sup>3</sup> Clinical Genetics and Postgraduate Program in Pathology Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil

<sup>4</sup> Institute of Medical Genetics, University of Zürich, Zürich, Switzerland.

\* Corresponding author:

Ida Vanessa Doederlein Schwartz

Serviço de Genética Médica – Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Rua Ramiro Barcelos, 2350 – 90035-003 – Porto Alegre – RS – Brazil

Tel.: 55 51 21018011 Fax: 55 51 21018010

Email: [ida.ez@terra.com.br](mailto:ida.ez@terra.com.br)

**E-mail addresses:** Oswaldo Artigalás ([artigalas@gmail.com](mailto:artigalas@gmail.com)), Giorgio Paskulin ([paskulin@ufcspa.edu.br](mailto:paskulin@ufcspa.edu.br)), Mariluce Riegel ([riegel@medgen.uzh.ch](mailto:riegel@medgen.uzh.ch)), Ida V. Schwartz ([ida.ez@terra.com.br](mailto:ida.ez@terra.com.br)).

## Abstract

The etiologic heterogeneity of arylsulfatase A (ARSA) deficiency is widely known: although it is more frequently associated with metachromatic leukodystrophy (MLD) and pseudodeficiency of ARSA, it can also be secondary to multiple sulfatase deficiency and, *in-vivo*, to saposin B deficiency. This paper emphasizes the need to expand the list of differential diagnosis of ARSA deficiency to including 22q13 deletion syndrome (Phelan-McDermid syndrome), an increasingly recognized syndrome associated with a relatively unspecific clinical phenotype. We describe a Brazilian male patient, sent for genetic evaluation at 10 years of age due to mental retardation, absence of speech, low activity of ARSA in leukocytes and presumable diagnosis of MLD. At the physical examination, no major abnormalities were observed. The brain imaging was normal. Further metabolic tests confirmed the presence of low activity of ARSA in leukocytes and fibroblasts, but the pattern of sulfatide excretion in urine was normal. The investigation of ARSA gene showed the presence of the allele associated with pseudodeficiency, and karyotype showed the presence of *de novo* unbalanced translocation involving 16p11.2 and 22q13 regions. FISH and array-CGH showed a terminal deletion of the long arm of chromosome 22, including the ARSA gene, and the presence of the subtelomeric 16p region, making the diagnosis of 22q13 deletion syndrome. This interesting case reinforces the importance of performing a cytogenetic investigation in patients with mental retardation and ARSA deficiency, especially if the clinical picture is not suggestive of MLD.

**Key Words:** 22q13 deletion, array-CGH, arylsulphatase A pseudodeficiency, metachromatic leukodystrophy.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

*To the Editor:*

We read with interest the paper by Bisgaard et al (2008) entitled “*Chromosomal deletion unmasking a recessive disease: 22q13 deletion syndrome and metachromatic leukodystrophy*”, which describes two patients with low activity of arylsulfatase A (ARSA) secondary to the loss of heterozygosity of ARSA gene. In the article, Bisgaard et al. suggest the measurement of ARSA activity should be performed in all patients with 22q13 deletion syndrome. Due to the case reported below, we suggest, on the other hand, that the cytogenetic investigation is performed in all patients with mental retardation and ARSA deficiency, especially if the clinical picture is not suggestive of metachromatic leukodystrophy (MLD).

We evaluated a male patient, 10 years of age, who presented low activity of ARSA in leukocytes (1.6 nomles/h/mg prot, RV: 5-20) (Tab.1) and diagnosis of MLD, but whose clinical picture was not typical of this disease. He was the first son of a healthy young and non-consanguineous couple, without family history of genetic diseases, and who had a healthy younger brother. The patient was born through vaginal delivery, 35-week pregnancy, in gestation associated with oligohydramnios, APGAR 7/8. At birth, he presented weight = 2630g, length = 46cm, head circumference = 32cm. He acquired head support at 7 months of age; sat without support at 18 months of age and walked without support at 24 months of age. He did not develop verbal language and acquired control of sphincters only at 8 years of age. At 3, he presented absence-type epileptic crises, progressing to frequent atonic crises, with full control of crises only after 18 months of treatment with phenobarbital, carbamazepine and valproic acid. The additional following investigations - all normal – had been previously performed: brain computerized tomography and magnetic resonance; analysis of trinucleotide expansions associated with X-fragile syndrome; blood thin-layer chromatography of aminoacids; dosage of very-long-chain fatty acids and measurement of the activities of hexosaminidases A and B and chitotriosidase in plasma; urinary thin-layer chromatography of amino acids, of oligosaccharides and of sialosaccharides; and urinary gas chromatography of organic acids. At the physical examination, he presented normal anthropometry, elongated face, arched eyebrows, long eyelashes, diastasis of upper central incisors, dropping feet, normal and symmetric

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

deep tendinous reflexes, hypertonia of lower limbs and choreoathetosis. The measurement of ARSA activity was repeated, with values below the normal range (Tab.1). As there was no evidence of high levels of sulfatides in urine (Tab.1), this patient was analyzed for the presence of the most common ARSA pseudodeficiency allele [p.N350S; c.1524+95A>G], which resulted positive (Tab.1 1). At that point, as the patient presented mental retardation of unknown cause, a GTG-banded karyotype was performed in peripheral blood, showing an apparent balanced reciprocal translocation between the short arm of a chromosome 16 and the long arm of a 22 chromosome [46,XY,t(16;22)(p11.2;q13)], in all 30 metaphases analyzed. The parents showed normal karyotypes (Tab. 1, Fig. 1). FISH investigations with the subtelomeric probes for the short arm of chromosome 16 and the long arm of chromosome 22, and the DiGeorge/VCFS Probe TUPLE1(22q11.2)/ARSA control probe(22q13.3) were performed. The analysis revealed an unbalanced translocation between the short arm of chromosome 16 and the long arm of chromosome 22. The FISH analysis showed a deletion of the ARSA control probe (22q13.3) and a deletion of the subtelomeric 22q region in one of the chromosome 22. No deletion of the DiGeorge/VCFS Probe TUPLE1(22q11.2) region or subtelomeric region 16p was detected. Array CGH was performed on DNA from the proband using a 60-mer oligonucleotide-based microarray containing about 44,000 60-mer probes (Agilent Human Genome Microarray, customer array design AMADID number 017457). Arrays were analysed using the AGILENT DNA Microarray Scanner and the AGILENT Feature Extraction software (v9.5.3).The Array-CGH revealed a terminal deletion of the long arm of chromosome 22 of a size of approximately 1.4 Mb, including the ARSA gene (Fig. 2). No deletion of the subtelomeric region 16p was detected. These results were compatible with the diagnosis of 22q13 deletion syndrome. Therefore, ARSA deficiency, in this case, was due to the hemizyosity for the pseudodeficiency allele.

In a patient with ARSA deficiency, four conditions are typically considered, namely: 1) MLD; 2) ARSA pseudodeficiency; 3) multiple sulfatase deficiency; and 4) saposin B deficiency (associated with ARSA deficiency *in vivo* only) (2). We suggest that the investigation of 22q13 deletion syndrome be

1  
2  
3 included in these differential diagnoses. This is essential for the genetic  
4 counseling, as, for instance, risk of recurrence of this syndrome, considering an  
5 isolated case with parents showing no abnormalities in the cytogenetic evaluation,  
6 is <1% (3), which is considerably lower than the 25% associated with MLD.  
7 Besides that, the therapeutic management of ARSA deficiency depends on the  
8 definitive etiologic diagnosis and may include, as in the case of MLD, bone marrow  
9 transplantation and enzyme replacement in the future (4); in the case of 22q13  
10 syndrome, the use of intranasal insulin is being evaluated (5).  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18

### 19 **Acknowledgments**

20 The authors declare that they have no conflicting financial interests. They thank Dr.  
21 Roberto Giugliani, Dr. Maira Burin, Dr. Maria Luiza Saraiva Pereira, Dr. Sharbel  
22 Maluf, Dr. Cristina B. Netto and Dr. Mercedes Villanueva, for their help in the  
23 execution of this study. This study was conducted with the support of the  
24 FIPE/HCPA, CNPq/Brazil and Swiss National Foundation (Nr. 320000-113635).  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

## References

1. Bisgaard AM, Kirchhoff M, Nielsen JE, et al. Chromosomal deletion unmasking a recessive disease: 22q13 deletion syndrome and metachromatic leukodystrophy. *Clin Genet* 2009; 75(2):175-179.
2. Gieselmann V. Metachromatic leukodystrophy. In: Barranger JA, Cabrera-Salazar MA, eds. *Lysosomal Storage Disorders*. New York: Springer, 2007: 287-306.
3. Gardner RJM, Sutherland GR, eds. *Chromosome Abnormalities and Genetic Counseling*. Oxford monographs on medical genetics, no.17. Oxford: Oxford University Press, 1989: 144-159.
4. Biffi A, Lucchini G, Rovelli A, Sessa M. Metachromatic leukodystrophy: an overview of current and prospective treatments. *Bone Marrow Transplant* 2008; 42 Suppl 2:S2-6.
5. Schmidt H, Kern W, Giese R, et al. Intranasal insulin to improve the developmental delay in children with 22q13 deletion syndrome: an exploratory clinical trial. *J Med Genet* 2008; Oct 23. [Epub ahead of print] PMID: 18948358

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

## Legends

**Figure 1** – Partial GTG-banded karyotype (550 band level) of the patient showing the breakpoints (arrows) of the t(16;22)(p11.2;q13) on the der(16) and der(22) chromosomes.

**Figure 2** – Chromosome 22 array CGH ratio profile using DNA from the proband and a reference DNA from a normal male. **(A)** The  $\log_2$  ratio of the chromosome probes is plotted as a function of chromosomal position. A copy number loss, shifting the ratio to the left in a value of about  $-1x$ , is observed on the distal 22q region (arrow). **(B)** Detail of the subtelomeric 22q region showing a deletion of an approximately 1.4 Mb segment which includes the *ARSA* gene. The first probe in deletion: A\_14\_P108133;chr22:48138838-48138897; last probe in deletion/array: A\_14\_P119941;chr22:49525071-49525130; normal proximal flanking probe: A\_14\_P127774;chr22:47981771-47981830.

**Table 1** – Summary of the investigation conducted in the patient and his family.

Figures

Figure 1

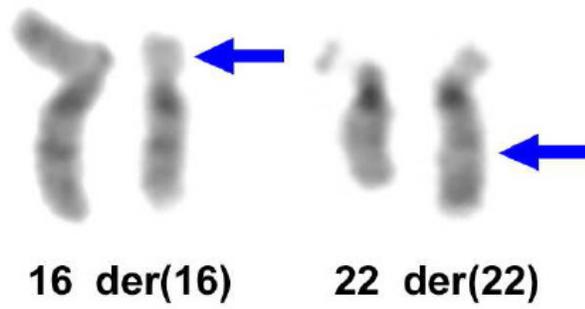
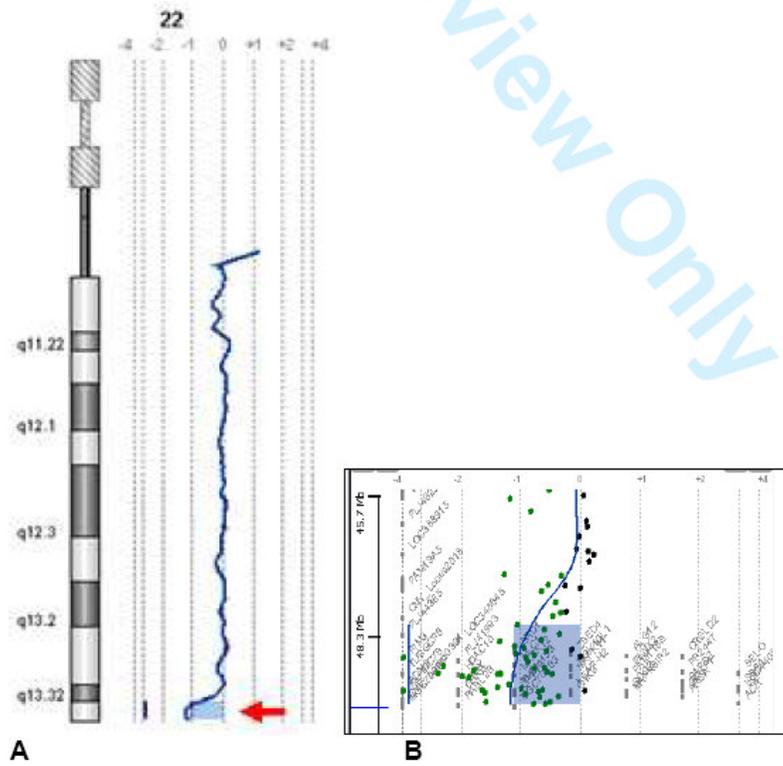


Figure 2



1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

Table 1

	Patient	Mother	Father
<b>ARSA in leukocytes</b> (RV: 5-20 nmol/h/mg prot)	1st) 1.6 2nd) 0.2 3rd) 2.1 4th) 1.2	NE	NE
<b>ARSA in fibroblasts</b> (RV: 20-50 nmol/h/mg prot)	1st) 0.76 2nd) 0.31	NE	NE
<b>Urinary chromatography of sulfatides</b>	Normal (3 different samples)	NE	NE
<b>ARSA pseudoallele</b> [p.N350S; c.1524+95A>G]	Present	Heterozygous	Heterozygous
<b>GTG-banded karyotype</b>	46,XY,t(16;22)(p11.2;q13)[30]	46,XX[30]	46,XY[30]

NE – not evaluated

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

## **6. ARTIGO 3:**

Multiple Sulfatase Deficiency: a misdiagnosed condition?

(Artigo a ser submetido ao periódico *Metabolic Brain Disease*)

## **MULTIPLE SULFATASE DEFICIENCY: A MISDIAGNOSED DISORDER?**

Oswaldo Alfonso Artigalás<sup>1,2</sup>, Luiz Roberto da Silva<sup>3</sup>, Maira Burin<sup>2</sup>, Gregory M. Pastores<sup>4</sup>, Bai Zeng<sup>4</sup>, Nívea Macedo<sup>3,5</sup>, Ida vanessa Schwartz<sup>1,2</sup>

1 Postgraduate Program in Genetics and Molecular Biology, Department of Genetics, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

2 Medical Genetics Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil

3 University Hospital, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, Brazil

4 Neurogenetics Unit, Department of Neurology and Pediatrics, New York University School of Medicine, New York, NY, USA

5 AACD, Uberlândia, Uberlândia, MG, Brazil

\* Corresponding author:

Ida vanessa Doederlein Schwartz  
Serviço de Genética Médica – Hospital de Clínicas de Porto Alegre  
Rua Ramiro Barcelos, 2350 – 90035-003 – Porto Alegre – RS – Brazil  
Tel.: 55 51 21018011 Fax: 55 51 21018010  
Email: [ida.ez@terra.com.br](mailto:ida.ez@terra.com.br)

## ABSTRACT

Multiple Sulfatase Deficiency (MSD) is a rare autosomal recessive disease in which the activities of all sulfatases are reduced; its estimated prevalence is 1:1.4 million births. The disease is caused by mutations in *SUMF1*, which encodes an enzyme involved in the post-translational modification of sulfatases. The MSD phenotype is a combination of the clinical features found in diseases resulting from a deficiency of the individual sulfatases; i.e., mucopolysaccharidosis II, IIIA, IIID, IVA and VI, metachromatic leukodystrophy, X-linked ichthyosis, and the X-linked recessive form of chondrodysplasia punctata. We describe herein the first case of a Brazilian patient with MSD. The case was initially diagnosed as having mucopolysaccharidosis (MPS), due to skeletal alterations, coarse facial features, and urinary excretion of dermatan sulfate and heparan sulfate. Later, after a detailed biochemical investigation, the diagnosis of MSD was established. The analysis of the *SUMF1* showed the patient was a compound heterozygote for two novel mutations (p.R349G and p.F244S). This case illustrates the challenges in the diagnosis of a disease considered rare, such as MSD. We point out that the availability of therapy for certain MPS disorders necessitates correct disease assignment, and the need to exclude the likelihood of MSD.

**KEY WORDS:** Multiple sulfatase deficiency; sulfatases; *SUMF1*; mental retardation; lysosomal storage disorders; LSD.

## INTRODUCTION

Multiple Sulfatase Deficiency (MSD, OMIM #272200) is a rare lysosomal storage disorder (LSD) transmitted as an autosomal recessive trait, in which all known sulfatases present deficient activity, resulting in *the* accumulation of glycosaminoglycans (GAG) and sulfated lipids (Hopwood and Ballabiao, 2001). Extremely rare, its estimated prevalence is <1:1,000,000 births (Meikle et al, 1999).

The responsible gene, *SUMF1* (OMIM \*607939), is located on chromosome 3p26.2; it is comprised of 9 exons encoding the SUMF1 protein (sulfatase modifying factor 1), which catalyzes the conversion of a highly conserved cysteine within the catalytic domain of sulfatases into a C- $\alpha$ -formylglycine (Dierks et al, 2008). This post-translational modification is essential for the enzymatic activity of all human sulfatases. Pathogenic mutations involving both *SUMF1* alleles are therefore associated with reduced activity of sulfatases and, consequently, with the MSD phenotype. Around 30 gene defects have been described; mostly consisting of missense/nonsense type mutations (Schlotawa et al, 2008).

This paper reports the first Brazilian patient with MSD, and illustrates the difficulties in establishing of the diagnosis of a rare LSD associated with clinical heterogeneity in disease expression.

## CASE REPORT

The patient, a boy, was the only child of a healthy, young, non-consanguineous couple, with no family history of genetic diseases; born following an uncomplicated pregnancy (38 weeks) via cesarean delivery due to acute fetal distress. Birth weight was 2,630g, and APGAR scores were 8/9. Between the age of 4 and 8 months, he suffered from dysphagia as well as episodes of pneumonia; development was also noted to be delayed. Neurological evaluation at age 14 months revealed good eye contact, reaction to sound stimulus, and head control; he was able to sit but only with support. Distal tone of the lower limbs was 1+/4+ and deep tendon reflexes (DTR) were absent; upper limb movements were

adequate, and tone and DTRs were normal. Between the second and the third year of life, he regressed and exhibited global hypotonia. Clinical investigation revealed normal hepatic and renal function tests results and normal echocardiogram findings; brain CT showed volumetric reduction of cerebral hemispheres with no signs of leukodystrophy (Figure 1). EEG revealed accentuated disarrangement of basal activities and epileptic activity in left temporal lobe with secondary bisynchrony. CSF obtained by lumbar puncture showed elevated protein. The patient displayed mild coarse face, flat nasal bridge, short columella, and mild nasomaxillary hypoplasia (Figure 2), which led to the suspicion of LSD, more specifically a type of mucopolysaccharidosis (MPS). Since the age of 3 years he has presented seizures, generalized tonic type, partially controlled with antiepileptic drugs. During the course of her son's evaluation, the mother became pregnant, which ended in a miscarriage at the end of first trimester.

Urinary screening tests for MPS showed the presence of dermatan and heparan sulfates, as well as of high levels of total GAGs (300 ug/mg creatinine, RV: 67-124). The activities of iduronate-sulfatase (deficient in MPS II) and arylsulfatase B (deficient in MPS VI) in leukocytes were reduced (Table 1); no other enzyme activities were analyzed at that time. The patient was diagnosed as having two rare LSD - MPS II and MPS VI – and was referred for potential enzyme replacement therapy (ERT), which is available for both MPS disorders.

Evaluation by our team, when the boy was age 3 years and 10 months, revealed height 92cm ( $p < 3$ ), weight 12,500g ( $p < 3$ ), and head circumference 48.5cm ( $p 25$ ). Physical examination showed decreased visual acuity, nystagmus, hepatosplenomegaly, joint rigidity, pyramidal signs, axial hypotonia, limb rigidity, and mild ichthyosis (exfoliations mainly in the back and lower limbs). There was normal intraocular pressure, bilateral optic atrophy, and no evident ophthalmologic alterations on biomicroscopy. X-rays of the thorax and vertebral column were compatible with dysostosis multiplex (presence of oar-shaped ribs and hypoplasia of the anterosuperior portion of lumbar vertebrae) (Figure 3); X-ray of the hands showed cortical thinning, shortening of phalangeal and metacarpal bones, and contractures of distal interphalangeal joints. Nerve conduction tests revealed

findings compatible with severe axonal sensorimotor polyneuropathy. Polysomnography showed mild obstructive respiratory events, without repercussion in O<sub>2</sub> saturation; the apnea-hypopnea index was 6.1/hour. At the time, EEG showed severe derangement of basal activity and epileptic activity in the left temporal lobe. The ECG showed sinus rhythm with mild right ventricular overload, but the echocardiogram was normal.

The activities of the following enzymes were additionally analysed: iduronate-2-sulfatase and arylsulfatase B in fibroblasts, and arylsulfatase A, galactose-6S-sulfatase, arylsulfatase C, heparan sulfamidase, glucosamine-6-sulfatase, chitotriosidase, and beta-galactosidase (as reference enzyme). Only chitotriosidase and beta-galactosidase were normal; all other enzymes assayed showed reduced activity (Table 1). The urinary chromatography of sulfatides confirmed the presence of sulfatides, whereas chromatography pattern of sialo- and oligosaccharides in urine was normal. Based on the biochemical investigation and clinical picture of the patient, the assumption of the dual diagnosis of MPS II and MPS VI was discarded, and the diagnosis of MSD was established. Molecular analysis of the *SUMF1* gene was performed, and analysis of the complete sequence lead to identification of two novel mutations: p.F244S (exon VI) and p.R349G (exon IX).

Brain MRI was performed at the age of 4.5 years, and showed diffuse brain atrophy and enlargement of ventricles, without signs of demyelination (Figure 4). The transcranial duplex scan exam was compatible with absence of signs of hemodynamic decompensation in volume/pressure curve.

## DISCUSSION

To date, 17 human sulfatases have been described (Dierks et al, 2008). Isolated deficiencies of sulfatases are related to at least 8 distinct clinical entities as follows: five types of mucopolysaccharidosis (MPS II, iduronate-2-sulfatase deficiency; IIIA, heparan N-sulfatase deficiency; IIID, glucosamine-6-sulfatase deficiency; IVA, galactosamine-6-sulfatase deficiency; VI, arylsulfatase B deficiency), metachromatic leukodystrophy (MLD, arylsulfatase A deficiency), X-

linked ichthyosis (ICX, arylsulfatase C deficiency), and an X-linked recessive form of chondrodysplasia punctata (CDPX, arylsulfatase D deficiency) (Parenti et al, 1997). MSD combines phenotypic characteristics of these different LSD, such as hepatosplenomegaly, neuropsychomotor retardation, ichthyosis, coarse facial features and skeletal alterations (Yis et al, 2007), but its clinical manifestations are markedly variable. On one end of the clinical spectrum, referred to as “Saudi variant”, MSD patients can present with typical MPS skeletal alterations (dysostosis multiplex), mild alterations of the white matter, and absence of ichthyosis (al Aqeel et al, 1992). On the opposite end, there are patients in whom the deficiency of arylsulfatase A and C is predominant: so, they present ichthyosis and neurological involvement similar to MLD (Mancini et al, 2000).

MSD can be classified into four clinical forms: **very severe neonatal MSD**, with diagnosis is established in the first months of life, and symptomatology very similar to MPS, with death within the first 12 months of life; **severe late-infantile MSD**, with onset in the first year of life of neurological problems similar to the late-infantile form of MLD; **mild late- infantile MSD**, with symptoms occurring between the age of 2 and 4 years, with absence of intrauterine manifestations, facial dysmorphism, visceromegaly, and cardiopathy, and presence of a milder/slower neurodegeneration; and **juvenile MSD**, which is a rare subtype, associated with a few of the symptoms of MSD, such as ichthyosis and mental retardation (Schlotawa et al, 2008). No genotype-phenotype correlation has been established so far with any clinical form, but the severe neonatal subtype appears to be related to nonsense mutations and large deletions as well as to missense mutations which affect directly the active site of SUMF1 (Dierks et al, 2008).

Phenotypic overlap, disease rarity, and wide clinical variability are aspects that should be considered in the diagnostic investigation of any inborn error of metabolism. In the case reported herein, the neurological symptoms were preponderant (delayed neuropsychomotor development, seizures and spasticity), making it similar to MLD; however, the patient did not present the typical finding of demyelination in the central nervous system, which is characteristic of the late-infantile MLD. As to the diagnosis of MPS, there was discrete facial dysmorphism, hepatosplenomegaly, flexural contracture in hands, and dysostosis multiplex, but

no signs of severe obstruction of upper airways, corneal opacification or cardiac alterations, which are frequent manifestations of MPS. X-rays did not reveal fine puncta in the distal phalanges, a finding typical of CDPX which tends to disappear between 2 and 3 years of age, but the flat nasal bridge, short columella, and mild nasomaxillary hypoplasia characteristic of this condition were evident. Therefore, on the basis of our clinical findings, we believe the patient described can be classified as having the severe late-infantile form of MSD.

MSD does not have a specific treatment. ERT with the use of purified SUMF1 (also called formylglycine generating enzyme, FGE) presents the usual challenge of treatment for a LSD - specifically the need to overcome the blood-brain barrier. The use of both different recombinant sulfatases commercially available (idursulfase, for the treatment of MPS II, and galsulfase, for MPS VI) would not be adequate for the various aspects of the disease. However, patients in whom the clinical picture is predominantly compatible with MPS II or MPS VI may be candidates for ERT. For instance, Sandberg et al. (2007) showed significant improvement in a patient with MSD treated with human recombinant arylsulfatase B (Galsufase). In that case, the main clinical manifestations were similar to those of the MPS VI. Bone marrow transplantation and the use of chaperones are other theoretical therapeutic possibilities (Dierks et al, 2008).

*SUMF1* is associated with allelic heterogeneity and with extremely variable effects as to the activity of different sulfatases. Our patient, the first MSD Brazilian case described in the literature, is a carrier of two missense mutations not previously described. In order to exclude the assumption that both alleles are actually nonpathogenic mutations, we performed a computational comparative analysis of the sequences through PolyPhen (Polymorphism Phenotyping, <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph>). Both mutations appeared as probably harmful, a category with the highest chance of being harmful. Besides, missense mutations at sites close or identical to those of the mutations described herein have been described in other patients with MSD. The p.R349W mutation, which involves the substitution of an amino acid of a conserved residue from subdomain 3 of SUMF1 protein, has been described as pathogenic (Dierks et al, 2003; Preusser-Kunze et al, 2005). No changes at position 244 of the protein has been

described previously; however, mutations in close sites both downstream and upstream have been reported, namely: p.R224W, p.S234R, p.G247R, and p.N259I (Dierks et al, 2005).

*SUMF1* mutation analysis is important in genetic counseling and prenatal diagnosis of MSD (Dierks et al, 2008). In the case described herein, the delayed diagnosis of the index case precluded genetic counseling on particular points before the second pregnancy. As individual assays of various sulfatases may not provide definitive results, mutation analysis can facilitate prenatal diagnosis in cases wherein the causal mutations are known. Mutation analysis in these cases also enable the possibility of pre-implantation diagnosis.

We point out that the abnormalities found in urinary screening tests for LSD should always be correlated with the clinical picture and confirmed by appropriate laboratory investigation. The diagnosis of MSD reported herein illustrates the potential for misdiagnosis, when based on the interpretation of an isolated laboratory finding or a superficial clinical exam finding. With the availability of treatment for certain LSD, exclusion of the diagnosis of MSD is critical so patients are not committed to ERT that may not be beneficial in their case.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

The authors declare that they have no conflicting financial interests. The authors would like to thank Dr. Simone Fagondes, Dr. Diane Marinho, and Dr. Jefferson Becker for their help in evaluating this patient; they would also like to thank the MPS-BRAZIL Network for its support for the metabolic investigation. This study was conducted with the support of FIPE/HCPA and CNPq/Brazil.

## REFERENCES

al Aqeel A, Ozand PT, Brismar J, Gascon GG, Brismar G, Nester M, Sakati N (1992). Saudi variant of multiple sulfatase deficiency. *J Child Neurol* (7); Suppl:S12-21.

Cosma MP, Pepe S, Parenti G, Settembre C, Annunziata I, Wade-Martins R, Di Domenico C, Di Natale P, Mankad A, Cox B, Uziel G, Mancini GM, Zammarchi E, Donati MA, Kleijer WJ, Filocamo M, Carrozzo R, Carella M, Ballabio A (2004). Molecular and functional analysis of *SUMF1* mutations in multiple sulfatase deficiency. *Hum Mutat* 23(6):576-81.

Dierks T, Schmidt B, Borissenko LV, Peng J, Preusser A, Mariappan M, von Figura K (2003). Multiple sulfatase deficiency is caused by mutations in the gene encoding the human C(alpha)-formylglycine generating enzyme. *Cell* 113:435-444.

Dierks T, Dickmanns A, Preusser-Kunze A, Schmidt B, Mariappan M, von Figura K, Ficner R, Rudolph MG (2005). Molecular basis for multiple sulfatase deficiency and mechanism for formylglycine generation of the human formylglycine-generating enzyme. *Cell* 121(4):541-52.

Dierks T, Schlotawa L, Frese MA, Radhakrishnan K, von Figura K, Schmidt B (2008). Molecular basis of multiple sulfatase deficiency, mucopolipidosis II/III and Niemann-Pick C1 disease - Lysosomal storage disorders caused by defects of non-lysosomal proteins. *Biochim Biophys Acta*; Dec 10. [Epub ahead of print] PMID: 19124046

Hopwood JJ, Ballabio A. Multiple sulfatase deficiency and the nature of the sulfatase family. In: Scriver CR, Baudet AL, Sly WS, editors. *The metabolic and molecular basis of inherited disease*, 8th ed., vol. III. New York: McGraw-Hill; 2001. p. 3725-32.

Mancini GMS, van Diggelen OP, Hujimans JG, Stroin H, de Coo RFM (2001). Pitfalls in the Diagnosis of Multiple Sulfatase Deficiency. *Neuropediatrics* 32:38-40.

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

Parenti G, Meroni G, Ballabio A (1997). The sulfatase gene family. *Curr Opin Genet Dev* 7(3):386-91.

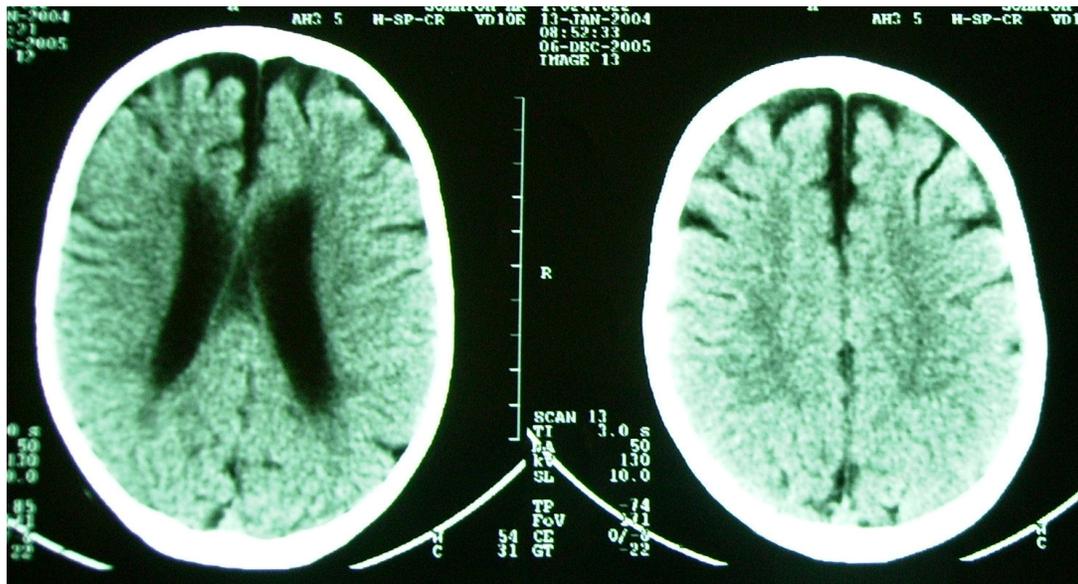
PolyPhen. <http://coot.embl.de/PolyPhen>

Preusser-Kunze A, Mariappan M, Schmidt B, Gande SL, Mutenda K, Wenzel D, von Figura K, Dierks T (2005) Molecular characterization of the human Calpha-formylglycine-generating enzyme. *J Biol Chem* 280(15):14900-14910.

Sandberg S, Charnas L, Braunlin E, Bjoraker K, Deanching M, Hoganson G, Rimell R, Whitley C (2007). Treatment of multiple sulfatase deficiency with recombinant human arylsulfatase B. *Mol Genet Metab* 92(4):31.

Schlotawa L, Steinfeld R, von Figura K, Dierks T, Gärtner J (2008). Molecular analysis of SUMF1 mutations: stability and residual activity of mutant formylglycine-generating enzyme determine disease severity in multiple sulfatase deficiency. *Hum Mutat* 29(1): 205-218.

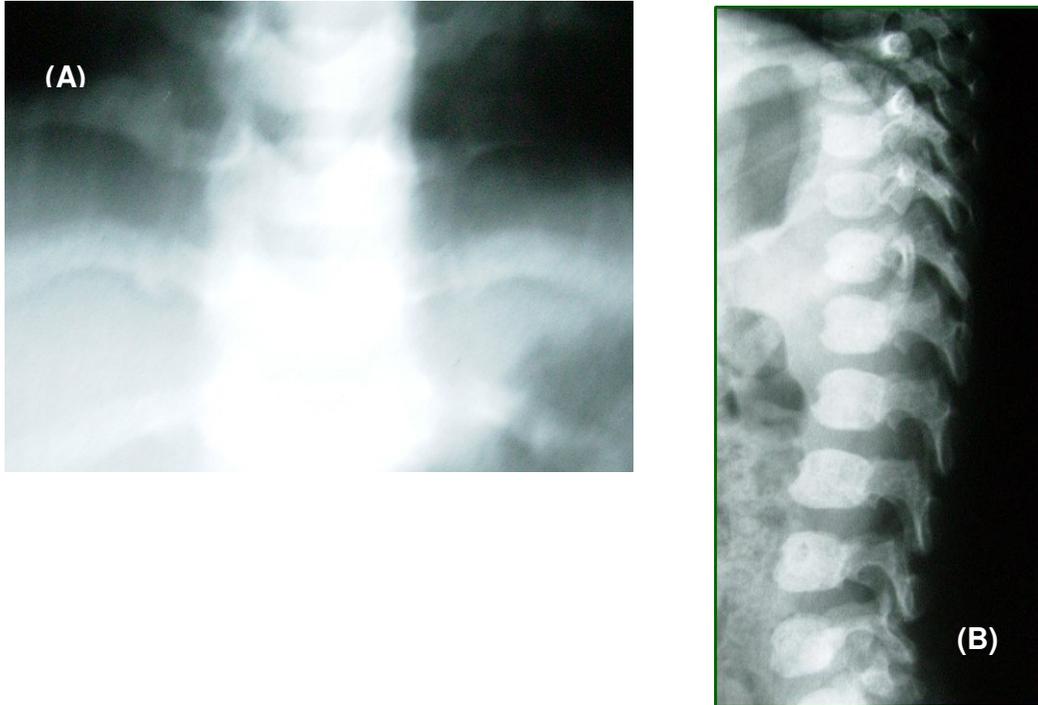
**FIGURES AND TABLES:**



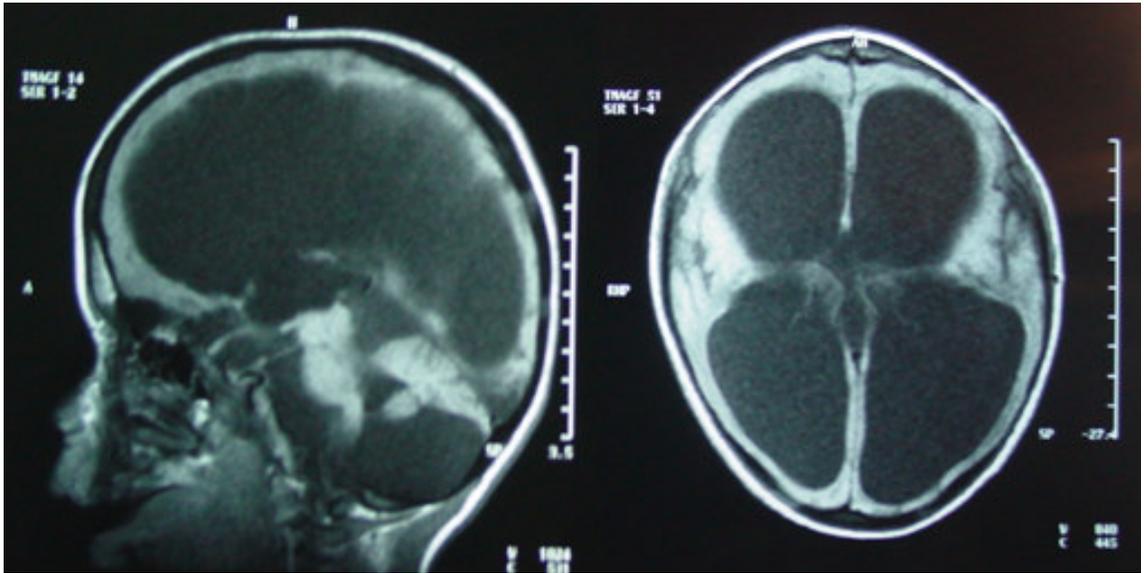
**Figure 1:** Brain CT scan showing cortical atrophy and ventricular enlargement. No signs of demyelination were found (age 2 years).



**Figure 2:** Patient at the age of 2.5 years, showing a mild coarse face, broad nasal bridge, short columella, and flat nose, with spastic position and tendon contractures.



**Figure 3:** X-ray findings (age of 3 years and 10 months): (A) oar-shaped ribs (B) ovoid vertebral bodies with hypoplasia of anteriosuperior corners.



**Figure 4:** Brain MRI T2-weighted image showing diffuse brain atrophy and enlargement of ventricles, without signs of demyelination. Patient was 4.5 years.

**Table 1:**  
Enzyme assays performed in the patient.

<b>Enzyme</b> (disease associated with the deficient enzyme activity)	<b>Biological material</b> (unit)	<b>Activity</b> (patient)	<b>Reference Values</b>
Alpha-N-acetylglucosaminase-6-sulfatase (MPS IIID)	fibroblasts (nmol/24h/mg protein)	1.07	31-135
Arylsulfatase A (MLD)	leukocytes (nmol/h/mg protein)	0.27	5-20
Arylsulfatase A (MLD)	fibroblasts (nmol/h/mg protein)	Undetectable	5-20
Arylsulfatase B (MPS VI)	leukocytes (nmol/h/mg protein)	2.4	72-176
Arylsulfatase B (MPS VI)	fibroblasts (nmol/h/mg protein)	13.	327-430
Arylsulfatase C (ICX)	fibroblasts (nmol/h/mg protein)	0.6	8.7-12
Beta-galactosidase (GM1 Gangliosidosis)	leukocytes (nmol/h/mg protein)	103	78-280
Chitotriosidase	plasma (nmol/h/mL)	107	8.8-132
Galactose-6-sulfate sulfatase (MPS IVA)	leukocytes (nmol/h/mg protein)	Undetectable	0.44-1.89
Galactose-6-sulfate sulfatase (MPS IVA)	fibroblasts (nmol/h/mg protein)	0.09	0.44-1.89
Iduronate-sulfatase (MPS II)	leukocytes (nmol/h/mg protein)	Undetectable	31-110
Iduronate-sulfatase (MPS II)	fibroblasts (nmol/4h/mg protein)	21	35-80

MPS II: mucopolysaccharidosis type II; MPS: mucopolysaccharidosis; MLD: metachromatic leukodystrophy; ICX: X-linked ichthyosis.

## **7. ARTIGO 4**

Punctate calcifications in lysosomal storage disorders

(Artigo aceito para publicação no periódico *Clinical Dysmorphology*, IN PRESS)



## Punctate calcifications in lysosomal storage disorders

Ida Vanessa Doederlein Schwartz<sup>a,b</sup>, Osvaldo Artigalás<sup>a,b</sup>, Markus Ries<sup>c,d</sup>,  
Joe T.R. Clarke<sup>e</sup>, Roberto Giugliani<sup>a,b</sup> and Michael Beck<sup>c</sup>

Clinical Dysmorphology 2009, 00:000–000

<sup>a</sup>Medical Genetics Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre,  
<sup>b</sup>Department of Genetics, Post Graduation Program in Genetics and Molecular  
Biology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil, <sup>c</sup>Children's Hospital  
of the Johannes-Gutenberg University, Langenbeckstraße 1, Mainz,  
Germany, <sup>d</sup>Shire Human Genetic Therapies, Clinical Research and  
Development, Cambridge, Massachusetts, USA and <sup>e</sup>Hospital for Sick  
Children, Toronto, Canada

Correspondence to Ida Vanessa Doederlein Schwartz, Serviço de Genética  
Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rua Ramiro Barcelos 2350,  
90035-003 Porto Alegre, RS, Brazil  
Tel: +55 51 21018011; fax: +55 51 21018010; e-mail: ida.ez@terra.com.br

Received 22 July 2008 Accepted 19 February 2009

### List of main features

Tracheal calcification  
Laryngeal calcification  
Stippled or fragmented epiphysis

### Introduction

Punctate epiphyseal calcifications (PEC) are caused by a diverse group of conditions. According to Poznanski (1994), this kind of calcification indicates a nonspecific radiological sign and does not itself represent a disease. They may be an inherited part of certain bone dysplasias or an incidental finding occasionally occurring in various disorders. PEC have been described in chromosomal anomalies, peroxisomal disorders, vitamin K disorders, toxic conditions, and have been associated with certain syndromes (e.g. Smith-Lemli-Opitz syndrome); their birth prevalence is estimated at 0.09 per 10 000 births in Italy (Camera and Mastroiacovo, 1982). Together with other radiological findings the pattern of the punctate helps make the correct diagnosis (Poznanski, 1994). PEC have already been reported in lysosomal storage disorders (LSDs) (Table 1), but the significance of making the diagnosis of an LSD has not been evaluated yet. In this study, we report a group of patients who presented both with punctate calcifications and LSD; our aim is to emphasize LSD as a differential diagnosis for PEC.

### Case reports

We describe four patients with the clinical and enzymatic diagnosis of LSD: mucopolipidosis II (n:3) and multiple sulfatase deficiency (n:1). Diagnosis was made by enzyme assays using artificial 4-methylumbelliferyl substrates (Kleijer *et al.*, 1979). In addition to radiological changes in the skeleton typical of dysostosis multiplex, these patients were found to have punctate calcifications as a leading radiological sign.

#### Case 1

This male child was born at 33 weeks of gestation through Cesarean section because of a pathological cardiotocogram.

In the first month, global development delay and reduced weight gain were noticed. Brain ultrasound at 6 months of age revealed hydrocephalus. MRI studies revealed global brain atrophy and premature synostosis of the metopic suture, as well as enlargement of all ventricles without signs of intracranial pressure. The following were found in the radiological investigations: signs of dysostosis multiplex, ovoid vertebral deformities and medial clefting of vertebral bodies, and craniosynostosis. Furthermore, the sacrum and femoral epiphyses showed multiple calcifications (Fig. 1). Echocardiogram showed mitral valve regurgitation. This boy suffered from a mixed obstructive and central sleep apnoea syndrome. Large adenoids, a small larynx and a combined laryngotracheomalacia with intermittent diameter reduction of 50% were also found. At the age of 2.5 years, this moderately mentally retarded patient presented with muscular hypotonia, disproportionate dwarfism, severe kyphoscoliosis, hepatosplenomegaly, turricephaly, middle-face hypoplasia, and gingival hyperplasia. The following are the results of lysosomal enzymes measured in serum:  $\beta$ -glucuronidase was elevated to 600,  $\alpha$ -L-fucosidase to 250,  $\alpha$ -mannosidase to 3100, and hexosaminidase A to 3100% of normal. These results confirmed the diagnosis of mucopolipidosis II.

#### Case 2

Data about the family and the prenatal/neonatal history of this female patient could not be obtained because she was adopted just after her birth. At the age of 1.5 years, the girl was referred to the evaluating service by her neurologist because she presented coarse face, small stature, and delayed neurological development. Her parents referred that she presented clubfeet at birth and that they noticed there was something different about her face when she was 1 week old. Surgery for clubfeet was performed at the age of 3 months. She was able to eat only small amounts of food and presented repetitive upper airway infections. The physical examination performed at the age of 2 years showed a head

Table 1 Lysosomal storage disorders as differential diagnosis of punctate calcifications

Disease	Deficient protein	Inheritance	Natural substrate	References
Galactosialidosis	Cathepsin A deficiency	AR	Sialyl-oligosaccharides	Patel <i>et al.</i> (1999)
GM1-gangliosidosis	$\beta$ -Galactosidase	AR	GM1 ganglioside, galactosyl-oligosaccharides, keratan sulfate, $\beta$ -galactosyl-glycoconjugates	Taybi and Lachmann (1996)
Metachromatic leukodystrophy	Arylsulfatase A or saposin B	AR	Galactocerebroside sulfate	Taybi and Lachmann (1996)
Mucopolipidosis II	<i>N</i> -acetylglucosamine-1-phosphotransferase	AR	Oligosaccharides, mucopolysaccharides, multiple complex lipids	Brubakk <i>et al.</i> (1983), Whelan <i>et al.</i> (1983), Pazzaglia <i>et al.</i> (1989), Beck <i>et al.</i> (1995)
Multiple sulfatase deficiency	C-formylglycine-generating enzyme	AR	Dermatan, heparan sulfate, chondroitin sulfate, keratan sulfate, galacto-cerebroside sulfate, steroid sulfates	Burch <i>et al.</i> (1986)
Niemann-Pick disease	Acid sphingomyelinase	AR	Sphingomyelin	Lachman <i>et al.</i> (1973), Taybi and Lachmann (1996)
Sialidosis	$\alpha$ -Neuraminidase	AR	Sialyl-oligosaccharides	Tabardel <i>et al.</i> (1989)
Infantile sialic acid storage disease	Lysosomal transport protein sialin	AR	Sialic acid	Hale <i>et al.</i> (1995)

AR, autosomal recessive.

circumference of 45 cm, height of 72 cm, and weight of 8.65 kg. The patient presented with dolichocephaly, obstructive breathing, mucopurulent rhinitis, coarse face, epicanthus, upward palpebral fissures, long eyelashes, pigeon chest, umbilical hernia, claw hands, joint contractures, thoracolumbar gibbus, thick skin, and hirsutism. She was unable to walk by herself. She was able to sit without support and to speak two-syllable words. Her echocardiogram was normal. Sleep oxymetry showed desaturation below 90 in 98% of the recorded time. Cranial computed tomography revealed asymmetry of ventricles (right > left). Radiographic examinations showed signs of dysostosis multiplex and punctate calcifications in the calcaneus (Fig. 2). In the laboratory evaluation, toluidine blue test was negative, and oligo/sialoligosaccharides chromatography and glycosaminoglycans chromatography were normal. The following enzyme activities were found in plasma:  $\beta$ -glucuronidase 631 nmol/l/h/ml (n: 30–300), hexosaminidase A 7.250 nmol/l/h/ml (n: 550–1675), hexosaminidase B 25.020 nmol/l/h/ml (n: 262–1219),  $\alpha$ -mannosidase 155.2 nmol/l/h/ml (n: 9.4–24), and  $\alpha$ -galactosidase 60 nmol/l/h/ml (n: 8.9–39). These results confirmed the diagnosis of mucopolipidosis II. The girl died of pneumonia at the age of 3.3 years.

### Case 3

This male patient was the first child born to a first cousin healthy couple from Pakistan. His delivery was by Cesarean section at 39 weeks of gestation. His birth weight was 2647 g (3rd percentile) and his occipital-frontal circumference was 33 cm (15th percentile). This boy had craniofacial dysmorphism, including trigonocephaly, bitemporal narrowing, hypotelorism, prominent eyes and cheek, very flat nasal bridge, short nose, micrognathia, and slightly low-set ears. Limb examination showed webbing of the right hand between the thumb and the index finger, and clinodactyly of the fourth and fifth fingers. He showed mild psychomotor delay associated with possible hearing problems. Brain computed tomography scan confirmed synostosis of the

metopic and sagittal sutures, normal appearance of the brain, and mildly enlarged subarachnoid space. Chest radiograph revealed pectus carinatum and Morgagni-type diaphragmatic hernia. Skeletal survey confirmed widening of the pubic symphysis, stippled calcification in the region of the coccyx, lumbar vertebral bodies and mid and hind feet (Figs 3 and 4), thick ribs, abnormal rib number, and stippled epiphyseal calcifications. Examination of the cardiovascular system, eyes, palate, and external genitalia was normal. Chromosomal analysis revealed a normal male karyotype (46, XY). A peroxisomal disorder was suspected in this case. The analysis of very-long-chain fatty acids, phytanic acid, and erythrocyte plasmalogens was normal. The *FGFR2* gene (Exons IIIa and IIIc) and the *FGFR3* gene (p.P250R) were studied in this patient, but no mutations were detected. When reassessed at 18 months of age, his facial features had coarsened, and he had developed gingival hyperplasia. He had experienced recurrent otitis media and had developed obstructive sleep apnoea requiring nocturnal continuous positive airway pressure. His development had slowed down at all levels, but he did not show any regression. His rate of somatic growth had slowed down symmetrically. He had developed contractures of the large joints and marked skin thickening. A repeat skeletal survey showed dysostosis multiplex as well as shallow acetabula, ovoid lumbar vertebral bodies, and calcaneal stippling. Urinary glycosaminoglycan screen was positive, and there was a mild elevation in keratan sulfate on thin-layer chromatography. Plasma hexosaminidase and arylsulfatase A activities were markedly elevated, whereas leukocyte activities were diminished, which confirmed the diagnosis of mucopolipidosis II.

### Case 4

This male patient was the first child of unrelated parents. Pregnancy was complicated by premature labor. His birth was spontaneous at 37 weeks of gestation; birth weight was 2950 g, and length was 48 cm. On account of unusual facial features, a chromosomal abnormality was suspected,

Fig. 1



Case 1 (mucopolipidosis II): male, 2.5 years old. Note the multiple calcifications in the sacrum and femoral epiphyses.

but a normal male karyotype was found. At the age of 2 months, a bilateral herniotomy was necessary; the cardiological evaluation showed right ventricular hypertrophy, persistent foramen ovale, and pulmonary hypertrophy. In the chest radiograph, multiple calcifications were present in both larynx and trachea (Fig. 5). At the

age of 4 months, a cerebral ventricular-peritoneal shunt was necessary because of hydrocephalus. At the age of 9 months, mild splenomegaly, two cysts in the right kidney, and mild corneal clouding were found; further radiographic studies of chest, pelvis, hands, and head showed the characteristic features of dysostosis multiplex.

Fig. 2



Case 2 (mucopolipidosis II): female, 2 years old. Note the punctate calcifications in the calcanei.

Fig. 3



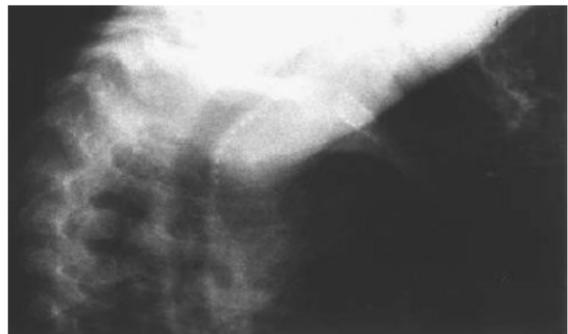
Case 3 (mucopolipidosis II): male, 1.5 years old. Note stippled calcifications in the mid and hind feet.

Fig. 4



Case 3 (mucopolipidosis II): male, 1.5 years old. Note stippled calcifications in the mid and hind feet.

Fig. 5



Case 4 (multiple sulfatase deficiency): male, 2 months old. Note multiple calcifications in both larynx and trachea.

Urinary glycosaminoglycan excretion was increased; in electrophoresis, dermatan, chondroitin, and heparan sulfate were detected. Deficiency of arylsulfatase A,

*N*-acetylgalactosamine-4-sulfatase, and iduronate-2-sulfatase confirmed the diagnosis of multiple sulfatase deficiency. This boy died of heart failure at the age of 11 months.

## Discussion

Mucopolipidosis II (MIM#252500; the most severe form of the phosphotransferase deficiency) and multiple sulfatase deficiency (MIM#272200) are rare LSDs associated with punctate calcifications. Phosphotransferase (*N*-acetylglucosamine-1-phosphotransferase) plays a key role in the formation of the mannose 6-phosphate recognition marker of newly synthesized lysosomal enzymes (Braulke *et al.*, 2008). A defect of the recognition marker leads to abnormal trafficking in mucopolipidosis II. Instead of being secreted into the lysosome, large amounts of lysosomal enzymes are secreted into the extracellular space at the same time that their substrates accumulate in the lysosomes (Kawashima *et al.*, 2007). Multiple sulfatase deficiency is caused by mutations in the *SUMF1* gene, which is involved in cotranslational or posttranslational modification that all sulfatases require for their full catalytic activity (Yis *et al.*, 2008). At least 17 human sulfatases have been described and can be deficient in this disorder (Diez-Rouze and Ballabio, 2005), and at least eight enzymatic deficiencies exist separately as a single disease entity (mucopolysaccharidosis type II, III-A, III-D, IV-A and VI; metachromatic leukodystrophy; X-linked ichthyosis, and X-linked recessive chondrodysplasia punctata). Thus, the phenotype and enzymatic spectrum in multiple sulfatase deficiency is a combined composition of all these individual conditions (Guerra *et al.*, 1990).

The localization of the stippled calcifications in our patients was heterogeneous, even within the mucopolipidosis II group. However, larynx and trachea were affected only in the child with multiple sulfatase deficiency, whereas stippling was localized in the axial skeleton in the mucopolipidosis II group. Besides stippled calcifications, all children had dysostosis multiplex. It should be pointed out that the children with mucopolipidosis II (all with premature synostosis) did not show these calcifications in the skull; therefore, the clinical significance and consequences of these calcifications for bone development remain unclear. A clinical picture of multiple sulfatase deficiency similar to that of case 4, with onset at birth, has been previously reported in the literature (Burk *et al.*, 1981; Vamos *et al.*, 1981; Burk *et al.*, 1984; Burch *et al.*, 1986; Busche *et al.*, 2008). The early-onset patients reported by Vamos *et al.* (1981) and Burch *et al.* (1986) also had multiple epiphyseal dysplasia, but only the patient reported by Burch *et al.* (1986) presented with stippled calcifications.

The detailed pathogenesis of PEC, especially in LSD, remains unclear. Takechi and Itakura (1995) studied the functions of lysosomes in the ossification process, and concluded that rough endoplasmic reticulum and lysosome-rich chondrocytes may be responsible for the resorption of uncalcified cartilage matrix, inducing the osteoclastic resorption of the calcified bone matrix;

hypertrophic-clear chondrocytes die, whereas the rough endoplasmic reticulum and lysosome-rich cells survive, suggesting that these cells are transformed into osteogenic cells. One might speculate that an altered lysosomal metabolism within LSD may accelerate this transformation and induce calcification. It has further been shown that nitric oxide (NO)-treated chondrocyte-derived apoptotic bodies can precipitate calcium, which may contribute to the pathological cartilage calcification observed in aging and osteoarthritis (Hashimoto *et al.*, 1998). Apoptotic mechanisms associated with calcification remain to be studied in LSD. It has, however, been shown that chondroitin sulfate (a storage material found in LSD) stimulates proteoglycan production and induces apoptosis of articular chondrocytes (Bali *et al.*, 2001). Simonaro *et al.* (2001) showed that articular chondrocytes grown from MPS VI (arylsulfatase B deficiency) rats and cats released increased amounts of NO and tumor necrosis factor- $\alpha$ , inducing apoptosis. Dermatan sulfate also induced NO release from normal chondrocytes, suggesting that glycosaminoglycan accumulation and presence of inflammatory cytokines are responsible for increased cell death of chondrocytes (Simonaro *et al.*, 2001). In contrast, mucopolipidosis II fibroblasts showed a decreased response to several unrelated apoptotic stimuli, suggesting a general involvement of lysosomes in different forms of programmed cell death (Terman *et al.*, 2002). Irrespective of the mechanism for their appearance, the presence of PEC should raise the possibility of LSD.

## Acknowledgements

The authors thank Dr Pranesh Chakraborty, the MPS-BRAZIL Network, the Brazilian Agency for Research (CNPq) and the Post Graduation Program in Genetics and Molecular Biology, UFRGS, Brazil. The views and opinions expressed in this publication do not necessarily reflect those of Shire Human Genetic Therapies.

## References

- Bali JP, Cousse H, Neuzil E (2001). Biochemical basis of the pharmacologic action of chondroitin sulfates on the osteoarticular system. *Semin Arthritis Rheum* 31:58–68.
- Beck M, Barone R, Hoffmann R, Kratzer W, Rakowsky T, Nigro F, Fiumara A (1995). Inter- and intrafamilial variability in mucopolipidosis II (I-cell disease). *Clin Genet* 47:191–199.
- Braulke T, Pohl S, Storch S (2008). Molecular analysis of the GlcNAc-1-phosphotransferase. *J Inher Metab Dis* 31:253–257.
- Brubakk AM, Cambier PH, Ginsel LA, vande Kamp JJ, Liem KO (1983). New finding in a patient with I-cell disease. *Tijdschr Kindergeneesk* 50:130–144.
- Burch M, Fensom AH, Jackson M, Pitts-Tucker T, Congdon PJ (1986). Multiple sulfatase deficiency presenting at birth. *Clin Genet* 30:409–415.
- Burk R, Valle D, Thomas G, Moser A, Moser H, Rosenbaum K, Schmid K (1981). Multiple sulfatase deficiency (MSD): clinical and biochemical studies in two patients. *Am J Hum Genet* 33:73A.
- Burk RD, Valle D, Thomas GH, Miller C, Moser A, Moser H, Rosenbaum KN (1984). Early manifestations of multiple sulfatase deficiency. *J Pediatr* 104:574–578.
- Busche A, Hennermann JB, Bürger F, Proquitté H, Dierks T, von Amim-Baas A, Horn D (2008). Neonatal manifestation of multiple sulfatase deficiency. *Eur J Pediatr* [Epub ahead of print] PMID: 19066960.

- Camera G, Mastroiacovo P (1982). Birth prevalence of skeletal dysplasias in the Italian Multicentric Monitoring system for Birth defects. *Prog Clin Biol Res* 104:441–449.
- Diez-Rouz G, Ballabio A (2005). Sulfatases and human disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 6:355–79.
- Guerra WF, Verity MA, Fluharty AL, Nguyen HT, Philippart M (1990). Multiple sulfatase deficiency: clinical, neuropathological, ultrastructural and biochemical studies. *J Neuropathol Exp Neurol* 49:406–423.
- Hale LP, van de Ven CJ, Wenger DA, Bradford WD, Kahler SG (1995). Infantile sialic acid storage disease: a rare cause of cytoplasmic vacuolation in pediatric patients. *Pediatr Pathol Lab Med* 15:443–53.
- Hashimoto S, Ochs RL, Rosen F, Quach J, McCabe G, Solan J, et al. (1998). Chondrocyte-derived apoptotic bodies and calcification of articular cartilage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:3094–3099.
- Kawashima I, Ohsawa M, Fukushige T, Nagayama Y, Niida Y, Kotani M, et al. (2007). Cytochemical analysis of storage materials in cultured skin fibroblasts from patients with I-cell disease. *Clin Chim Acta* 378:142–146.
- Kleijer WJ, Hoogeveen A, Verheijen FW, Niermeijer MF, Galjaard H, O'Brien JS, Warner TG (1979). Prenatal diagnosis of sialidosis with combined neuraminidase and beta-galactosidase deficiency. *Clin Genet* 16:60–61.
- Lachman R, Crocker A, Schulman J, Strand R (1973). Radiological findings in Niemann-Pick disease. *Radiology* 108:659–664.
- Patel MS, Callahan JW, Zhang S, Chan AK, Unger S, Levin AV, et al. (1999). Early-infantile galactosialidosis: prenatal presentation and postnatal follow-up. *Am J Med Genet* 85:38–47.
- Pazzaglia EU, Beluffi G, Castello A, Coci A, Zatti G (1989). Bone changes of mucopolipidosis II at different ages. Postmortem study of three cases. *Clin Orth Rel Res* 276:283–290.
- Poznanski AK (1994). Punctate epiphyses: a radiological sign not a disease. *Pediatr Radiol* 24:418–424.
- Simonaro CM, Haskins ME, Schuchman EH (2001). Articular chondrocytes from animals with a dermatan sulfate storage disease undergo a high rate of apoptosis and release nitric oxide and inflammatory cytokines: a possible mechanism underlying degenerative joint disease in the mucopolysaccharidoses. *Lab Invest* 81:1319–1328.
- Tabardel Y, Soyeur D, Vivario E, Senterre J (1989). Primary neuraminidase deficiency with prenatal disclosure. *Arch Fr Pediatr* 46:737–740.
- Takechi M, Itakura C (1995). Ultrastructural and histochemical studies of the epiphyseal plate in normal chicks. *Anat Rec* 242:29–39.
- Taybi H, Lachmann RS. *Radiology of syndromes, metabolic disorders, and skeletal dysplasias*. 4th ed. St. Louis: Mosby-Year Book Inc; (1996).
- Terman A, Neuzil J, Kagedal K, Ollinger K, Brunk UT (2002). Decreased apoptotic response of inclusion-cell disease fibroblasts: a consequence of lysosomal enzyme missorting? *Exp Cell Res* 274:9–15.
- Vamos E, Liebaers I, Bousard N, Libert J, Perlmutter N (1981). Multiple sulfatase deficiency with early onset. *J Inher Metab Dis* 4:103–104.
- Whelan D, Chang PL, Cockshott PW (1983). Mucopolipidosis II: the clinical, radiological and biochemical features in three cases. *Clin Genet* 24:90–96.
- Yis U, Pepe S, Kurul SH, Cosma AMP, Dirik E (2008). Multiple sulfatase deficiency in a Turkish family resulting from a novel mutation. *Brain Develop* 30:374–377.

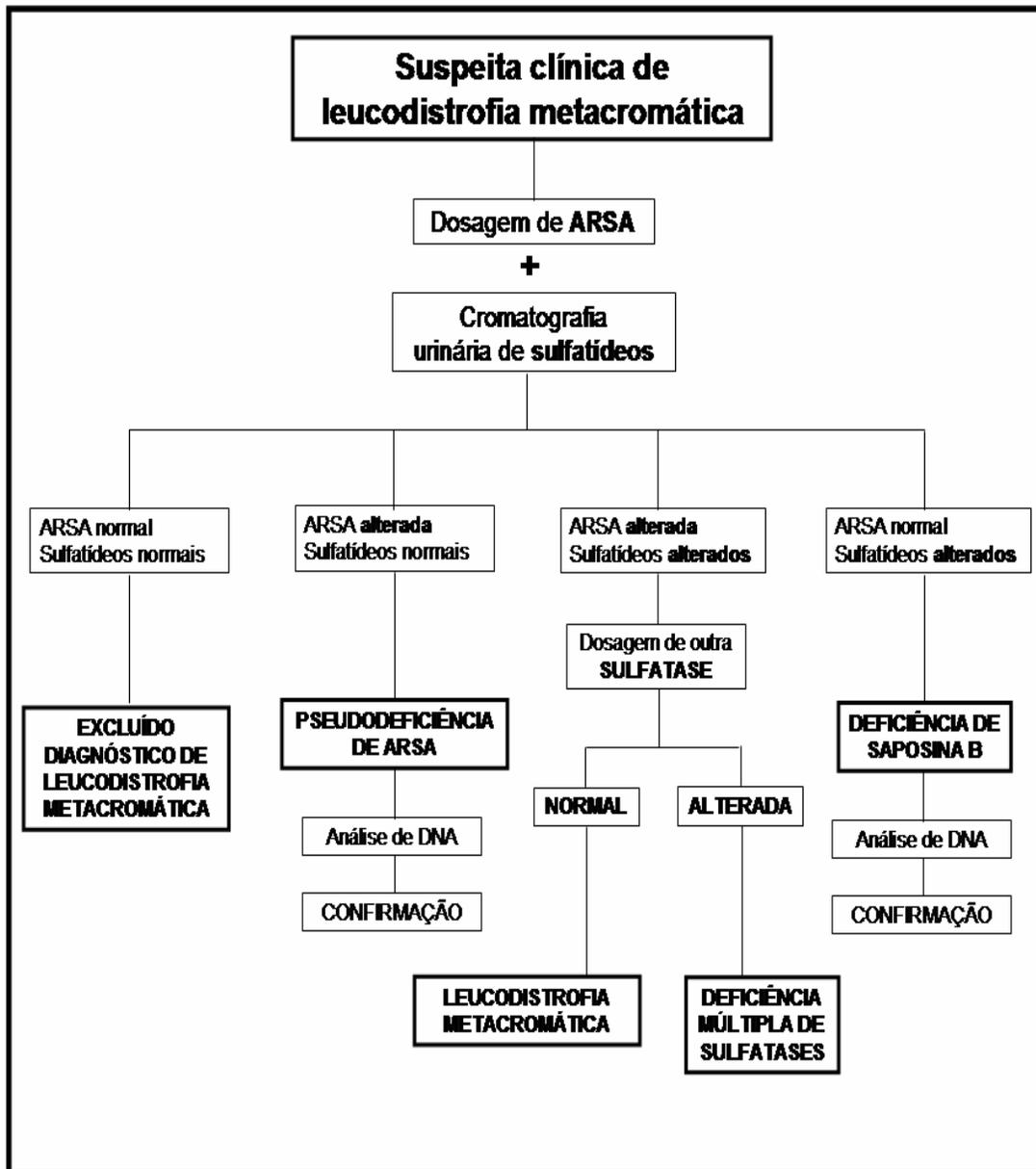
## 8. DISCUSSÃO

### 8.1 Dificuldades relacionadas ao diagnóstico de LDM no Brasil

A LDM, como a extensa maioria das doenças genéticas autossômicas recessivas, é uma condição rara em todo mundo. Os dados disponíveis sobre sua frequência são escassos, mas indicam que sua prevalência gira em torno 1,4–1,8 para 100.000 recém-nascidos vivos (Pinto *et al.*, 2004; Poorthuis *et al.*, 1999). Esse fato, por si só, já é uma explicação razoável para as dificuldades encontradas na compilação de informações mais detalhadas sobre a doença. Somam-se a isso as dificuldades inerentes ao diagnóstico bioquímico propriamente dito, para o qual se exige recursos tecnológicos nem sempre universalmente disponíveis na prática clínica rotineira, até mesmo em países desenvolvidos. Cabe ressaltar que o grau de suspeição clínica, que é o que direciona a investigação complementar, muitas vezes inexistente, em virtude do desconhecimento da doença pelos profissionais da saúde.

Assim exposto, é possível compreender melhor o reduzido número de estudos clínicos existentes descrevendo de forma detalhada a história natural da LDM, suas manifestações clínicas, perfil epidemiológico e achados bioquímicos. O objetivo deste trabalho foi justamente a descrição desses aspectos da doença em uma amostra de pacientes brasileiros, visando a uma melhor compreensão acerca dessa devastadora condição neurológica. Através da revisão da amostra de pacientes investigados pelo LEIM-SGM/HCPA, e que apresentava atividade de ARSA reduzida, verificou-se que grande parte dos casos apresentava uma investigação metabólica incompleta, isto é, que não preenchia todos os critérios para o estabelecimento ou exclusão do diagnóstico de LDM. Esses casos muitas vezes tinham investigação laboratorial restrita à dosagem de ARSA, não sendo realizada, por exemplo, a cromatografia urinária de sulfatídeos (importante para exclusão de PD-ARSA) ou dosagem da atividade enzimática de outra sulfatase (necessária para o diagnóstico diferencial de DMS). Em um primeiro momento, a principal justificativa para isso era a indisponibilidade de algum desses exames no LEIM-SGM/HCPA (como a cromatografia urinária de sulfatídeos), fato esse

superado no decorrer dos anos com a implantação das técnicas necessárias. Posteriormente, a continuidade da ocorrência de casos clínicos com investigação laboratorial incompleta pode ser justificada por diversos fatores, a saber: o desconhecimento por parte dos médicos assistentes dos critérios diagnósticos para essa condição, com a conseqüente requisição incompleta dos exames adequados; a dificuldade de acesso a centros de referência que disponibilizem de forma prática e ágil tais exames; e o envio inadequado (ou por vezes, insuficiente) de material biológico (como sangue, urina e pele) para a realização dos exames. Nesse contexto, a fundação da ONG Pela Vida surge como “divisor de águas”, na medida em que é criada com objetivos de divulgar para famílias e profissionais da saúde conhecimentos atualizados sobre a LDM, facilitar o acesso e promover o diagnóstico da LDM (através da parceria com LEIM-SGM/HCPA) e viabilizar pesquisas científicas voltadas para o tratamento da LDM. Isso pode ser nitidamente percebido através do número de diagnósticos de LDM realizados, um total de 23 casos confirmados (em 242 investigados) após 30 meses de parceria. Comparativamente, o LEIM-SGM/HCPA, no período de 1982 a 2006 (cerca de 25 anos), teve 90 casos identificados com atividade de ARSA reduzida, dos quais apenas 12 com diagnóstico de LDM confirmado, segundo os critérios aqui apresentados. Propõe-se aqui um fluxograma básico de investigação da LDM (Figura 6).



**Figura 6.** Fluxograma do diagnóstico bioquímico da LDM e de seus diagnósticos diferenciais.

Neste trabalho, foram recrutados 29 pacientes provenientes de todas as regiões do Brasil, sendo 15 da região Sudeste, 9 da região Sul, 3 da região Nordeste, 1 da região Centro-oeste e 1 da região Norte. A predominância de casos da região Sudeste era de certa forma esperada, já que se trata da região mais populosa do país e na qual existem diversos serviços médicos com experiência e qualidade no diagnóstico de DL. Desse modo, a região Nordeste

deveria ocupar a segunda posição em número total de diagnósticos, o que não ocorreu possivelmente em decorrência da dificuldade de acesso aos meios diagnósticos. Essa posição foi ocupada pela região Sul do país, onde está lotado o LEIM-SGM/HCPA, um dos centros de referência no diagnóstico laboratorial da LDM, o que provavelmente influenciou de forma direta no maior número de diagnóstico em relação à região Nordeste. Isso indica que a existência de centros de referência no diagnóstico de doenças metabólicas (bem como a proximidade geográfica e a facilidade de acesso) exerce um efeito significativo sobre o número de diagnóstico das mesmas. Embora sejam as regiões brasileiras com as menores populações, é importante notar que as regiões Norte e Centro-oeste tenham contribuído com apenas um caso de LDM cada, número inferior ao esperado para o número de habitantes que possuem. Através desse trabalho, fica claro que existe um significativo subdiagnóstico dessa doença no nosso país, o que pode ser visto em maior grau nos locais onde os recursos diagnósticos são mais limitados, mas que é algo disseminado também aos grandes centros do Brasil.

A dificuldade em se conseguir pacientes para inclusão na pesquisa realizada, retratada pelos 29 casos obtidos, é resultado da raridade da doença, do não-diagnóstico dos casos possivelmente existentes e da falta de integração da rede de saúde. Sabemos que nunca será possível a existência disseminada de laboratórios de EIM em todas as cidades brasileiras, de modo que fica evidente a necessidade da criação de redes de diagnóstico, que ponham em prática o modelo de referência/contra-referência não só no âmbito interno das Secretarias Estaduais de Saúde, mas também em termos interestaduais e inter-regionais. O registro adequado de informações clínicas por parte dos médicos assistentes é algo também digno de nota. Trabalhos retrospectivos, como o aqui descrito, em sua maioria se baseiam nesse tipo de informação, que quando incompleta ou pouco detalhada inviabiliza a realização de estudos com boa qualidade metodológica e com número de pacientes maiores.

Uma das grandes limitações do nosso trabalho está no reduzido número de pacientes, em especial das formas tardias (quatro pacientes com a forma juvenil e uma paciente com a forma adulta), o que inviabilizou análises estatísticas

comparativas. Desse modo, grande parte dos dados foi exposta de maneira descritiva, fornecendo informações sobre como determinadas variáveis se distribuem na nossa amostra de pacientes. A ampliação do número de pacientes é necessária para se tenham resultados com potencial de extrapolação maior para a prática clínica.

## **8.2 Caracterização dos pacientes brasileiros com LDM**

Nesse trabalho encontramos uma forte predominância da forma infantil tardia da LDM, que é o tipo mais freqüente segundo a literatura (Gieselmann, 2007). No entanto, o esperado era que essa forma representasse de 50 a 60% dos casos (Fluharty, 2008), bem abaixo dos quase 76% (n= 22/29) encontrados. Pode-se considerar que talvez na população brasileira haja realmente uma maior freqüência de casos graves e rapidamente progressivos, mas a hipótese de subdiagnóstico das formas tardias deve ser levada em consideração. Isso porque nessas formas o quadro clínico dos pacientes apresenta um predomínio de sintomas neuropsiquiátricos, nos quais comportamentos bizarros e déficits cognitivos progressivos são os achados iniciais mais proeminentes. Essa sintomatologia “não-clássica” poderia estar levando esses pacientes a diagnósticos equivocados (como, por exemplo, esquizofrenia), os quais depois de estabelecidos por um médico dificilmente são reconsiderados, mesmo quando da falta de resposta ao tratamento farmacológico. O curso crônico das formas adultas de LDM vem a favorecer esse tipo de situação, na qual o paciente passa por diversos médicos, clínicas e tratamentos, sem uma continuidade de acompanhamento e avaliação.

Alguns dos nossos achados reforçam (e quantificam) dados baseados na experiência clínica publicados em livros textos (von Figura *et al.*, 2001; Mabe-Santana, 2006; Gieselmann, 2007), de que as manifestações iniciais na forma infantil tardia são primariamente motoras, principalmente com repercussão na marcha das crianças afetadas, que passam a exibir uma deambulação hesitante, dependente de apoio e com quedas freqüentes. É interessante notar que alterações motoras também são freqüentes na forma juvenil, só que nesse tipo

clínico o percentual é praticamente equivalente ao das manifestações cognitivas e comportamentais. A aquisição dos marcos do desenvolvimento neuropsicomotor ocorre dentro da faixa etária adequada, não havendo atraso significativo nessa área, tanto nas formas infantil tardia como juvenil. Os pacientes com a forma infantil tardia passam, em média, a perder essas aquisições a partir dos dois anos de vida, enquanto que nos indivíduos com a forma juvenil isto acontece, em média, a partir dos 10 anos de idade, o que está de acordo com as definições da classificação clínica da LDM. Ainda não existem marcadores clínicos ou bioquímicos que possam definir com algum grau de certeza o fenótipo dos pacientes ou que forma clínica irão manifestar. A idade de início dos sinais e sintomas segue sendo o único dado que fornece alguma informação nesse sentido, mas essa não apresenta nenhum grau de correlação com os níveis de atividade enzimática de ARSA em leucócitos, como pudemos verificar no nosso trabalho. Assim, os níveis de ARSA não são suficientes para a determinação do prognóstico da LDM, sendo necessária à continuidade de estudos na busca de marcadores laboratoriais confiáveis. Em trabalhos recentemente publicados, é sugerido que sinais de polineuropatia podem ser as manifestações iniciais da doença na sua forma infantil, antes mesmo de alterações na RNM de cérebro (Haberlandt *et al.*, 2008) e que o comprometimento grave e precoce do sistema nervoso periférico estaria associado às formas mais agressivas e rapidamente progressivas da doença (Biffi *et al.*, 2008b); no presente estudo, não foi possível verificar a aplicabilidade dessas informações nos pacientes brasileiros, pelo reduzido número de pacientes com LDM forma juvenil que havia realizado ENMG. Contudo, cabe ressaltar o elevado percentual de pacientes (n=15/16) que apresentaram alterações em tal exame. Diferentemente da ENMG, os resultados da RNM de cérebro forneceram alguns achados bastante interessantes. O primeiro deles é o não-comprometimento inicial ou isolado da substância branca dos lobos fronto-temporais ou dos núcleos da base nos 21 pacientes com a forma infantil tardia que realizaram tal exame, ficando evidente que esse tipo de topografia em pacientes com leucodistrofia/alterações de substância branca, na faixa dos 0 aos 4 anos, não sugere o diagnóstico de LDM. No Brasil, quando o exame de imagem do SNC é realizado em pacientes com LDM, a grande maioria

dos mesmos já apresenta um comprometimento difuso da substância branca, muito em decorrência da dificuldade em se dispor desse tipo de exame de forma rápida pelo sistema público de saúde. Outro achado interessante foi a presença de três casos de LDM forma infantil tardia em que o exame de imagem mostrava apenas sinais de atrofia cerebral difusa (sem alteração de sinal em substância branca), os pacientes tinham de idade entre 2 e 3 anos, quando da realização do exame, sendo as manifestações iniciais de ataxia de marcha e quedas freqüentes que evoluíram rapidamente para restrição total ao leito e contato visual nulo; e um caso de LDM forma infantil tardia, na qual o início do quadro ocorreu em torno dos 14 meses de vida, com alteração na marcha (caminhava nas pontas dos pés) e quedas, cuja RNM realizada aos 17 meses ainda estava normal. Esse paciente evoluiu para quadro de espasticidade e hipertonia em membros inferiores (deambulando com apoio), mas mantendo interação com meio (sorriso social e monossílabos) até os 2 anos (data da última avaliação clínica). Isso indica que a ausência de alterações clássicas de LDM em uma RNM não exclui de forma definitiva esse diagnóstico.

Apesar das manifestações clínicas das LDM serem restritas ao sistema nervoso, seja central ou periférico, as repercussões devastadoras da doença exigem uma equipe multidisciplinar no cuidado desses doentes. Com vistas à busca da melhor qualidade de vida possível, o uso de anticonvulsivantes, sedativos, antipsicóticos e analgésicos é geralmente necessário. A participação do profissional de fisioterapia também é de grande valia, na realização de exercícios para melhoria motora e respiratória. A decisão sobre a realização de gastrostomia também é algo que muitas vezes não pode ser adiado, pois tal procedimento pode evitar episódios de broncopneumonias aspirativas (decorrentes dos distúrbios da deglutição que surgem com a progressão do quadro) e desnutrição crônica (comum entre pacientes restritos ao leito).

As manifestações clínicas da LDM forma infantil tardia iniciam, em geral, entre os 6 meses e os 2 anos (Gieselmann, 2007) (na amostra do presente estudo, esta variável apresentou mediana de 17,5 meses). No Brasil, o surgimento dos sinais/sintomas e o diagnóstico definitivo são separados por um largo período de tempo que pode chegar até a 6 anos nas formas tardias da

doença. Isso acaba repercutindo não só na qualidade da assistência prestada ao paciente (com a perda da indicação de TMO, em pacientes com as formas juvenil e adulta, e falta de prevenção de complicações comuns), mas também no aconselhamento genético das famílias. Muitas vezes os casais acabam por ter mais de um filho afetado pela mesma doença em decorrência da falta de informação. Em doenças genéticas raras e sem tratamento curativo (ou mesmo paliativo específico), como a LDM, o diagnóstico precoce surge com uma janela de oportunidade rara para o aconselhamento genético, o que reforça ainda mais a sua importância e pode ser verificado na inclusão de dois casos de pacientes ainda assintomáticos, cujo diagnóstico somente foi possível através de um irmão afetado, permitindo inclusive que uma dessas crianças fosse submetida ao TMO.

### **8.3 Deficiência de ARSA: ampliando o espectro diagnóstico e descrevendo doenças raras**

Neste estudo, através da revisão da amostra de pacientes do LEIM-SGM/HCPA que tinham atividade enzimática de ARSA reduzida foram identificados casos de pacientes que apresentavam deficiência dessa enzima, mas cujo quadro clínico não correspondia ao de LDM.

Retardo mental não-progressivo e achados dismórficos não fazem parte do quadro clínico da LDM, não podendo ser justificados pela deficiência de ARSA. No caso do paciente relatado no segundo artigo desta dissertação, o diagnóstico precipitado de LDM, baseado somente na dosagem enzimática, foi posteriormente corrigido. A síndrome de Deleção 22q13 ou síndrome de Phelan-McDermid (OMIM #606232), apesar da grande variabilidade clínica, geralmente apresenta-se com atraso global do desenvolvimento, hipotonia generalizada, comportamento autista e dismorfias menores ao exame físico (Phelan, 2008; Cusmano-Ozog *et al.*, 2008). A RNM de encéfalo nesses pacientes é normal ou mostra apenas um discreto afinamento de corpo caloso (Philippe *et al.*, 2008), diferindo nitidamente das alterações de substância branca da LDM. Como frisado por Bisgaard *et al.* (2009), alterações citogenéticas envolvendo a região 22q13 já foram descritas em mais de 100 casos na literatura. Os achados dismórficos são geralmente os mais

atentados do ponto de vista médico nesses pacientes, não se considerando, muitas vezes, a necessidade de avaliar genes contidos na região cromossômica envolvida e que poderiam explicar grande parte dos sinais e sintomas apresentados pelos pacientes. O gene *SHANK3* (MIM\*606230) mapeado na região 22q13.3 codifica uma proteína estrutural encontrada na densidade pós-sináptica, tendo a função de conectar canais iônicos e receptores na membrana pós-sináptica à membrana do citoesqueleto, para vias de transdução de sinal (Durand *et al.*, 2007). Wilson *et al.* (2008) propõe que a haploinsuficiência do gene *SHANK3* estaria relacionada às principais manifestações neurológicas da síndrome de deleção 22q13.3. A determinação precisa do diagnóstico diferencial nesses casos é fundamental para o aconselhamento genético correto da família, uma vez que o risco de recorrência (considerando um caso *de novo*) da síndrome de deleção 22q13.3 é inferior a 1% (Gardner e Sutherland, 1989), consideravelmente menor que os 25% de uma doença autossômica recessiva, como a LDM. Cabe ressaltar que a síndrome de deleção 22q13 também pode resultar de casos de mosaïcismo parental, recombinações de inversões pericêntricas maternas e cromossomos dicêntricos atípicos (Bonaglia *et al.*, 2008; Tagaya *et al.*, 2008; Babineau *et al.*, 2006), fatores complicadores no aconselhamento genético. Além disso, o manejo terapêutico é bastante distinto, pois pode incluir transplante de medula óssea e, futuramente, terapia de reposição enzimática, no caso da LDM (Biffi *et al.*, 2008) ou uso de insulina intranasal para as manifestações neurológicas na síndrome de deleção 22q13.3 (Schmidt *et al.*, 2008). Especialmente, nos casos atípicos de LDM, em que existam dismorfias menores (Figura 7) e o quadro neurológico seja predominantemente de atraso de linguagem e comportamento autista, sugerimos que a investigação da síndrome de deleção 22q13 deva ser incluída entre esses diagnósticos diferenciais.



**Figura 7.** Aspectos dismórficos faciais de pacientes com síndrome de deleção 22q13 ([www.22q13.org](http://www.22q13.org))

Doenças genéticas, de uma forma geral, são raras; logo, quando existe o “estabelecimento” do diagnóstico simultâneo de duas doenças autossômicas recessivas cada uma com frequência inferior a 1/100.000, esse deve ser questionado. Foi o que ocorreu no caso relatado no terceiro artigo desta dissertação, quando supostamente o paciente seria afetado por MPS tipo II e tipo VI, mas que uma avaliação criteriosa dos resultados dos exames laboratoriais trouxe à tona o diagnóstico de DMS. O estabelecimento do diagnóstico precoce permite um aconselhamento genético mais efetivo, e o direcionamento adequado das medidas terapêuticas.

A identificação de sinais e sintomas, achados laboratoriais ou exames complementares precoces que possam indicar ou levar à suspeição de uma doença metabólica rara é de extrema utilidade na prática clínica. Notadamente, porque possibilita o estabelecimento diagnóstico de forma mais ágil, economizando recursos (sempre escassos na saúde brasileira), reduzindo o número de intervenções e procedimentos diagnósticos a que os pacientes são submetidos e o tempo de espera das famílias em saber com que tipo de doença estarão envolvidas. Durante a realização desse trabalho, e através da parceria com colaboradores de outras instituições universitárias internacionais, foi fortalecido o papel de um marcador radiológico indicador de doenças metabólicas, especialmente de DL. Verificou-se que calcificações punctatas (CP) podem estar presentes em crianças com DMS e mucopolidose II (ML II). CP já foram descritas em diversas anomalias cromossômicas, doenças peroxissomais, distúrbios da vitamina K, intoxicações crônicas e certas síndromes genéticas (Patel *et al.*, 1999). As CP também já foram relatadas em algumas DL, como galactosialidose,

sialidose, LDM e gangliosidose GM1 (Patel *et al.*, 1999; Tabardel *et al.*, 1989; Taybi e Lachmann, 1996). O diagnóstico retrospectivo de diversas displasias esqueléticas, após o fechamento das cartilagens de crescimento (fusão das epífises com as metáfises), é geralmente difícil, freqüentemente incerto e por vezes impossível. O período considerado ótimo para o diagnóstico dessas displasias (sejam elas epifisárias, metafisárias ou mistas) é a idade escolar, quando se pode fazer uma clara distinção entre os achados metafisários e epifisários, pois estes ainda estão evidentes (Kozlowski *et al.*, 2006). A localização das CP no nosso grupo de pacientes foi extremamente variável, inclusive quando consideramos apenas o grupo com ML II. Calcificações em laringe e traquéia foram vistas somente na criança com DMS, enquanto que indivíduos com ML II tiveram predomínio do envolvimento do esqueleto axial. Além da presença das CP, todos os pacientes por nós descritos apresentaram disostose múltipla. Ainda que não estejam claros os mecanismos fisiopatológicos envolvidos na formação de calcificações do tipo punctata em DL, como a DMS e a ML II aqui descritas, fica evidente que esse achado radiológico passa a ser sinal claro de que a investigação diagnóstica desse grupo de doença é necessária quando da presença de tal alteração.

#### **8.4 Triagem neonatal para doenças lisossômicas**

As DL são doenças crônicas progressivas que têm um impacto devastador sobre o paciente e sua família. A maioria dos pacientes é clinicamente normal ao nascimento, mas desenvolve sinais e sintomas precoces ao longo da infância. Apesar de não existir tratamento curativo para a maioria delas, um número cada vez maior de opções terapêuticas estão tornando-se disponíveis. Na busca de melhores resultados para essas novas terapias, levanta-se a possibilidade de que o tratamento pré-sintomático ou “paucissintomático” seja uma necessidade premente. Nesse campo de discussão entra a triagem neonatal, que permite identificar indivíduos afetados precocemente ou ainda na fase assintomática. Argumentos em contrário vão no sentido de afirmar que muitas dessas terapias (como por exemplo, as TRE para MPS II e MPS VI) não têm mostrado resultados

suficientemente robustos que justificassem o investimento no desenvolvimento e universalização desses exames para o seu uso. A esse debate pode se fazer o paralelo com a indicação de TRE em pacientes com DMS, não qual o uso de todas as sulfatases recombinantes humanas disponíveis no mercado poderia ser testada, mas o benefício apontado no uso nas suas doenças específicas justificaria tentativas de tratamento nos pacientes como o do caso descrito no artigo 3. Profissionais isentos, e mesmo a comunidade, devem pensar e discutir de forma criteriosa sobre os riscos, vantagens e a relação custo-benefício dessas intervenções, tomando como base não somente o indivíduo, mas a sociedade como um todo.

## 9. CONCLUSÕES

**Objetivo 1:** Caracterizar os aspectos epidemiológicos da LDM no Brasil.

**Conclusões:** No Brasil, a LDM ocorre em todas as regiões, com maior predominância na região Sudeste, algo esperado em decorrência de sua densidade populacional. A região Nordeste, segunda em população no país, contudo, não apresenta percentual compatível ao número de habitantes, o que provavelmente ocorre devido às dificuldades para acessar serviços de saúde especializados, que possuam profissionais e recursos laboratoriais necessários para confirmação diagnóstica e manejo terapêutico. Isso pode ser melhor constatado no caso da região Sul, que com cerca de 15% da população brasileira, na amostra estudada representou 31% dos casos de LDM, muito provavelmente em função da presença de um centro de referência, como o LEIM-SGM/HCPA.

**Objetivo 2:** Verificar a idade do diagnóstico dos pacientes com LDM.

**Conclusões:** A idade média de diagnóstico dos pacientes com LDM infantil tardia foi de 39,05 meses, em média 21,05 meses após o início dos sintomas. Na forma juvenil, a idade média ao diagnóstico foi de 161,25 meses, 76,5 meses, em média, após o início dos sintomas. O atraso do diagnóstico é indicativo de que o conhecimento a respeito da LDM é muito escasso ou inexistente mesmo entre profissionais da saúde. Além disso, o estabelecimento do diagnóstico bioquímico da LDM no Brasil é normalmente dificultado pelo reduzido número de laboratórios habilitados para tanto, além dos custos serem, de modo geral, muito elevados.

**Objetivo 3:** Determinar a frequência relativa das formas clínicas de LDM (infantil tardia, juvenil e adulta) apresentada por pacientes brasileiros.

**Conclusões:** Dos 29 casos descritos, houve uma predominância marcante da forma infantil tardia que, com 22 casos (75,8%) descritos, é o tipo clínico mais prevalente na população brasileira. As formas tardias da LDM seja ela juvenil (quatro casos) ou adulta (apenas um caso), representaram menos de 20% da amostra. Isso pode ser em decorrência de uma menor prevalência real dessas formas da doença, ou em virtude de um subdiagnóstico. Manifestações mais

lentamente progressivas, quadros atípicos (sem alterações motoras) e sintomatologia psiquiátrica podem ser algumas das justificativas para esse dado.

**Objetivo 4:** Estudar a associação do fenótipo bioquímico com o fenótipo clínico da LDM nos pacientes estudados.

**Conclusões:** Nesse estudo, não foi encontrada correlação estatisticamente significativa ( $r=-0,09$ ;  $p=0,67$ ) entre os níveis de atividade enzimática de ARSA e a idade de início dos sintomas entre os pacientes com LDM.

**Objetivo 5:** Identificar marcadores clínicos, que possam contribuir para prever o prognóstico e curso clínico da doença.

**Conclusões:** Exames de imagem do sistema nervoso quando são realizados nos pacientes brasileiros com LDM, já mostram sinais de desmielinização difusa (13/27). Na forma infantil tardia, é relevante citar que nenhum dos 22 casos apresentava desmielinização isolada ou inicial na região fronto-temporal ou nos núcleos da base, ficando claro que esse tipo de topografia em pacientes com leucodistrofia na faixa do zero aos 4 anos, não sugere o diagnóstico de LDM. A ENMG se mostrou alterada (polineuropatia sensitivo-motora ou redução de velocidade de condução) em praticamente todos os casos que realizaram o exame, indicando que esse exame é extremamente útil para embasar a indicação de investigação bioquímica em pacientes com quadro sugestivo de LDM. Cabe ressaltar aqui os reduzidos percentuais de pacientes que realizaram estudos eletrofisiológicos (seja ENMG, potencial evocado auditivo, visual ou somatossensitivo), avaliação oftalmológica e avaliação para TMO, indicando claramente a inexistência de estrutura adequada para o acompanhamento e tratamento desses pacientes no Brasil. Melhorias das condições para o acompanhamento clínico e diagnóstico bioquímico passam a ser necessárias para o tratamento adequado dos pacientes com essa condição. O estabelecimento de protocolos assistenciais para o seguimento e manejo das complicações destes pacientes será fundamental na otimização da prática assistencial rotineira.

**Objetivo 6:** Contribuir para a caracterização de outras condições clínicas associadas à deficiência de arilsulfatase A, visando à ampliação do espectro de diagnósticos diferenciais desse achado laboratorial e à melhor caracterização fenotípica dessas condições.

**Conclusões:** A descrição de pacientes com diagnóstico diverso à LDM (como DMS, PD-ARSA e síndrome de deleção 22q13) que também cursam com atividade enzimática reduzida de ARSA, reforça a importância da realização do diagnóstico diferencial criterioso frente a esse achado laboratorial. O caso do primeiro paciente brasileiro descrito com DMS demonstra a importância da correlação clínico-laboratorial, no estabelecimento do diagnóstico de doenças raras. A presença de calcificações punctatas, a partir do que foi aqui relatado, passa a ser um achado radiológico marcador de possível doença lisossômica. Na presença dessas alterações, diagnósticos como DMS e ML II devem ser agora lembrados pelos médicos assistentes. Além disso, no caso da síndrome de deleção 22q13, vimos que essa condição deve ser incluída na lista de diagnóstico diferenciais da LDM, já que apesar do quadro clínico diferente (dismorfias faciais, retardo mental não-progressivo e ausência de leucodistrofia), os níveis de ARSA podem estar permanentemente reduzidos, quando da presença concomitante do alelo pseudodeficiente ou mutado junto à alteração citogenética.

## **10. PERSPECTIVAS**

### **10.1 Caracterização clínica e da história natural da LDM**

O estudo de características clínicas (como por exemplo, idade de início dos sintomas, manifestações iniciais e caracterização topográfica das principais manifestações neurológicas), laboratoriais (como atividade enzimática da ARSA e genótipo) e de exames complementares (como achados de ressonância nuclear magnética, eletroneuromiografia, potenciais evocados auditivos e visuais) realizado nesse trabalho gerou informações importantes para um melhor entendimento da doença e reforça a importância de uma busca mais aprofundada acerca de marcadores clínico-laboratoriais que possam prever com certo grau de confiabilidade o prognóstico dos pacientes com LDM. Entretanto, os achados são limitados devido ao pequeno tamanho da amostra.

Desse modo, o prosseguimento desse estudo mostra-se necessário para ampliação do número de pacientes, marcadores e correlações analisadas, uma vez que todas essas informações são agora fundamentais não só para o maior conhecimento da história natural dessa doença, mas também para avaliação de novas opções terapêuticas que surjam. Adicionalmente, a partir dos dados obtidos, espera-se também ser possível o delineamento de estratégias mais efetivas para o diagnóstico e o tratamento dos pacientes brasileiros com LDM.

### **10.2 Modelo animal de LDM**

O grupo de pesquisa em LDM, ao qual esse trabalho pertence, possui linhas de pesquisa sobre descoberta de novas opções terapêuticas para essa doença. Trabalhos com encapsulamento de células que superexpressam ARSA já foram realizados em nível laboratorial e a perspectiva da disponibilidade do modelo animal para futuras pesquisas nessa área é iminente. Esse modelo animal em camundongos foi criado e aperfeiçoado para contornar obstáculos de ordem operacional na pesquisa de fatores etiológicos associados, mecanismos fisiopatológicos e tratamento da LDM, permitindo inclusive a realização de

ensaios pré-clínicos fundamentais para embasar e direcionar ensaios clínicos em seres humanos com a doença.

### **10.3 Terapia de reposição enzimática para LDM**

A primeira opção terapêutica lembrada quando se pensa em tratamento de DL, como a LDM, é a reposição simples e direta da enzima deficiente na condição estudada. A chamada terapia de reposição enzimática, ou TRE, já é realidade para algumas DL (como doença de Gaucher, mucopolissacaridoses tipo I, II e VI e doença de Fabry), estando incorporada na prática assistencial desses pacientes.

A grande limitação dessa opção de tratamento é a dificuldade de moléculas grandes (como as enzimas recombinantes sintetizadas para a TRE) em passarem a barreira hemato-encefálica, o que impediria o tratamento das manifestações neurológicas centrais dos pacientes. A LDM é uma doença com manifestações clínicas exclusivamente neurológicas, sejam elas centrais ou periféricas, o que em teoria, não a torna uma boa candidata para TRE. No entanto, como já descrito na introdução desse trabalho, ensaios clínicos de fase I/II estão testando eficácia e segurança da enzima recombinante humana (rhARSA) em pacientes como a forma infantil tardia da doença. Conforme os resultados desses estudos e o prosseguimento de pesquisas nessa linha, poderá ser necessária a ampliação do presente estudo, para captação de pacientes a serem selecionados para ensaios clínicos de fase II/III, dando prosseguimento aos trabalhos na área.

### **10.4 Estudos de associação genótipo-fenótipo**

Através do conhecimento de quem são, onde estão e em que serviços de saúde são acompanhados os pacientes brasileiros com LDM, abre-se a possibilidade de realização de estudos mais detalhados de correlação genótipo-fenótipo na heterogênea população brasileira. A busca de marcadores clínicos e laboratoriais que possam ser relacionados a genótipos específicos é informação crucial e de grande aplicabilidade na prática médica assistencial.

Além disso, o estudo das interações genótipo-fenótipo pode esclarecer sobre as manifestações atípicas ou atenuadas da LDM, especialmente na forma adulta da doença ou em populações específicas, como a de doentes psiquiátricos. Isso poderá vir a ampliar a lista de diversos diagnósticos diferenciais, nos quais indicação de dosagem de ARSA possivelmente fará parte.

### **10.5 Investigação de deficiência de ARSA em grupos de risco**

O reduzido número de casos da forma adulta de LDM aqui encontrado e a presença de manifestações psiquiátricas freqüentes nesses indivíduos sugerem que sejam realizados estudos que investiguem a prevalência de deficiência de ARSA, alelos de PD-ARSA e alelos (R) associados a fenótipos leves em populações de pacientes psiquiátricos, como por exemplo, esquizofrênicos com manifestações atípicas ou com idade de início não usual.

## 11. REFERÊNCIAS

Anlar B, Waye JS, Eng B and Oguz KK (2006) Atypical clinical course in juvenile metachromatic leukodystrophy involving novel arylsulfatase A gene mutations. *Dev Med Child Neurol* 48:383-387.

Arvanitis D, Dumas M and Szuchet S (1992) Myelin palingenesis: Immunocytochemical localization of myelin/oligodendrocyte glycolipids in multilamellar structures. *Dev Neurosci* 14:328-335

Alzheimer A (1910) Beiträge zur Kenntnis der pathologischen Neuroglia und ihrer Beziehungen zu den Abbauvorgängen in Nervengewebe. *Nissl-aAlzheimer's Histol Histopathol Arb* 3:401. In: Scriver CH, Beaudet A, Sly W, Valle D (orgs) *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease* (2001). Editora McGraw-Hill, New York, pp 3695-3724.

Arbour LT, Silver K, Hechtman P, Treacy EP, Coulter-Mackie MB (2000) Variable onset of metachromatic leukodystrophy in a Vietnamese family. *Pediatr Neurol* 23:173-176.

Austin J (1958) Metachromatic sulfatides in cerebral white matter and kidney. *Proc Soc Exp Biol Med* 100:361. In: Scriver CH, Beaudet A, Sly W, Valle D (orgs) *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease* (2001). Editora McGraw-Hill, New York, pp 3695-3724.

Austin J, McAfee D, Armstrong D, O'Rourke M, Shearer L, Bachhawat B (1964) Low sulfatase activities in metachromatic leukodystrophy (MLD): a controlled study of enzymes in 9 living and 4 autopsied patients with MLD. *Trans Am Neurol Assoc* 89:147-150.

Babineau T, Wilson HL, Dawson AJ, Chodirker BN, Der Kaloustian VM, Demczuk S, McDermid HE (2006) Unusual dicentric chromosome 22 associated with a 22q13 deletion. *Am J Med Genet* 15;140:2819-2823.

Balslev T, Cortez MA, Blaser SI and Haslam RH (1997) Recurrent seizures in metachromatic leukodystrophy. *Pediatr Neurol* 17:150-154.

Baum H, Dodgson KS, Spencer B (1959) The assay of arylsulphatases A and B in human urine. *Clin Chim Acta* 4:453-455.

Baumann N, Masson M, Carreau V, Lefevre M, Herschkowitz N and Turpin JC (1991) Adult forms of metachromatic leukodystrophy: clinical and biochemical approach. *Dev Neurosci* 13:211-215.

Baumann N, Turpin JC, Lefevre M and Colsch B (2002) Motor and psychocognitive clinical types in adult metachromatic leukodystrophy: genotype/phenotype relationships? *J Physiol Paris* 96:301-316.

Berger J, Gmach M, Mayr U, Molzer B, Bernheimer H (1999) Coincidence of two novel arylsulfatase A alleles and mutation 459+1G>A within a family with metachromatic leukodystrophy: molecular basis of phenotypic heterogeneity. *Hum Mutat* 13:61-68.

Berger J, Löschl B, Bernheimer H, Lugowska A, Tylki-Szymanska A, Gieselmann V, Molzer B (1997) Occurrence, distribution, and phenotype of arylsulfatase A mutations in patients with metachromatic leukodystrophy. *Am J Med Genet* 31; 69:335-340.

Biffi A, De Palma M, Quattrini A, Del Carro U, Amadio S, Visigalli I, Sessa M, Fasano S, Brambilla R, Marchesini S, Bordignon C and Naldini L (2004) Correction of metachromatic leukodystrophy in the mouse model by transplantation of genetically modified hematopoietic stem cells. *J Clin Invest* 113:1118-1129.

Biffi A, Capotondo A, Fasano S, del Carro U, Marchesini S, Azuma H, Malaguti MC, Amadio S, Brambilla R, Grompe M, Bordignon C, Quattrini A, Naldini L (2006) Gene therapy of metachromatic leukodystrophy reverses neurological damage and deficits in mice. *J Clin Invest* 116:3070-3082.

Biffi A, Lucchini G, Rovelli A, Sessa M (2008) Metachromatic leukodystrophy: an overview of current and prospective treatments. *Bone Marrow Transplant* 42 Suppl 2:S2-6.

Biffi A, Cesani M, Fumagalli F, Del Carro U, Baldoli C, Canale S, Gerevini S, Amadio S, Falautano M, Rovelli A, Comi G, Roncarolo MG, Sessa M (2008b) Metachromatic leukodystrophy - mutation analysis provides further evidence of genotype-phenotype correlation. *Clin Genet* 74:349-357.

Bindu PS, Mahadevan A, Taly AB, Christopher R, Gayathri N, Shankar SK (2005) Peripheral neuropathy in metachromatic leucodystrophy. A study of 40 cases from south India. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 76:1698-1701.

Bisgaard AM, Kirchhoff M, Nielsen JE, Kibaek M, Lund A, Schwartz M, Christensen E (2009) Chromosomal deletion unmasking a recessive disease: 22q13 deletion syndrome and metachromatic leukodystrophy. *Clin Genet* 75:175-179.

Bonaglia MC, Giorda R, Beri S, Bigoni S, Sensi A, Baroncini A, Capucci A, De Agostini C, Gwilliam R, Deloukas P, Dunham I, Zuffardi O (2008) Mosaic 22q13 deletions: evidence for concurrent mosaic segmental isodisomy and gene conversion. *Eur J Hum Genet* 2008 Oct 15. [Epub ahead of print] PMID: 18854866

Bosio A, Binczek E and Stoffel W (1996) Functional breakdown of the lipid bilayer of the myelin membrane in central and peripheral nervous system by disrupted galactocerebroside synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:13280-13285.

Burk R, Valle D, Thomas G, Moser A, Moser H, Rosenbaum K and Schmid K (1981) Multiple sulfatase deficiency (MSD): clinical and biochemical studies in two patients. *Am J Hum Genet* 33:73A.

Burk, RD, Valle D, Thomas GH, Miller C, Moser A, Moser H and Rosenbaum KN (1984) Early manifestations of multiple sulfatase deficiency. *J Pediatr* 104: 574-578.

Chabás A, Castellvi S, Bayés M, Balcells S, Grinberg D, Vilageliu L, Marfany G, Lissens W and González-Duarte R (1993) Frequency of the arylsulphatase A pseudodeficiency allele in the Spanish population. *Clin Genet* 44:320-323.

Clinicaltrials.gov(<http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00418561?term=Metachromatic+leukodystrophy&rank=5>). Acessado no dia 5 de março de 2009.

Coelho JC, Wajner M, Burin MG, Vargas CR, Giugliani R (1997) Selective screening of 10,000 high-risk Brazilian patients for the detection of inborn errors of metabolism. *Eur J Pediatr* 156:650-654.

Cusmano-Ozog K, Manning MA, Hoyme HE (2007) 22q13.3 deletion syndrome: a recognizable malformation syndrome associated with marked speech and language delay. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 15; 145C:393-398.

Díaz-Font A, Santamaría R, Cozar M, Blanco M, Chamoles N, Coll MJ, Chabás A, Vilageliu L, Grinberg D (2005) Clinical and mutational characterization of three patients with multiple sulfatase deficiency: report of a new splicing mutation. *Mol Genet Metab* 86:206-211.

Dierks T, Schmidt B and von Figura K (1997) Conversion of cysteine to formylglycine: a protein modification in the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:11963-11968.

Durand CM, Betancur C, Boeckers TM, Bockmann J, Chaste P, Fauchereau F, Nygren G, Rastam M, Gillberg IC, Anckarsäter H, Sponheim E, Goubran-Botros H, Delorme R, Chabane N, Mouren-Simeoni MC, de Mas P, Bieth E, Rogé B, Héron D, Burglen L, Gillberg C, Leboyer M, Bourgeron T (2007) Mutations in the gene encoding the synaptic scaffolding protein SHANK3 are associated with autism spectrum disorders. *Nat Genet* 39:25-27.

Eckhardt M (2008) The role and metabolism of sulfatide in the nervous system. *Mol Neurobiol* 37:93-103.

Faerber EN, Melvin J, Smergel EM (1999) MRI appearances of metachromatic leukodystrophy. *Pediatr Radiol* 29:669-672.

Felice KJ, Gomez Lira M, Natowicz M, Grunnet ML, Tsongalis GJ, Sima AA, Kaplan RF (2000) Adult-onset MLD: a gene mutation with isolated polyneuropathy. *Neurology* 10;55:1036-1039.

Fluharty AL (2008) Arylsulfatase A deficiency. In: Gene Reviews (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=gene&part=mld>). Acessado em 11 de fevereiro de 2009.

Fukutani Y, Noriki Y, Sasaki K, Isaki K, Kuriyama M, Kurosawa K, Ida H (1999) Adult-type metachromatic leukodystrophy with a compound heterozygote mutation showing character change and dementia. *Psychiatry Clin Neurosci* 53:425-428.

Gardner RJM, Sutherland GR (eds) (1989) *Chromosome Abnormalities and Genetic Counseling*. Oxford monographs on medical genetics, no.17. Oxford: Oxford University Press, Oxford, pp 144-159.

Geurts van Kessel, AHM, Westerveld, A, de Groot PG, Meera Khan P and Hagemeyer A (1980) Regional localization of the genes coding for human ACO2, ARSA, and NAGA on chromosome 22. *Cytogenet Cell Genet* 28: 169-172.

Gieselmann V, Polten A, Kreysing J and von Figura K (1989) Mutations in arylsulfatase A pseudodeficiency: loss of a polyadenylation signal and N-glycosylation site. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:9436.

Gieselmann V, Polten A, Kreysing J and von Figura K (1994) Molecular genetics of metachromatic leukodystrophy. *J Inher Metab Dis* 17: 500-509.

Gieselmann V. Metachromatic Leukodystrophy. In: Barranger JA and Cabrera-Salazar MA (orgs) *Lysosomal Storage Disorders* (2007). Editora Springer, New York, pp 285-306.

Goebel HH, Busch-Hettwer H, Bohl J (1992) Ultrastructural study of the retina in late infantile metachromatic leukodystrophy. *Ophthalmic Res* 24:103-109.

Gort L, Coll MJ and Chabás A (1999) Identification of 12 novel mutations and two new polymorphisms in the arylsulfatase A gene: haplotype and genotype-phenotype correlation studies in Spanish metachromatic leukodystrophy patients. *Hum Mutat* 14:240-248.

Guibaud P, Garcia I and Guynet CL (1973). La detection de l'heterozygotisme pour la sulfatidase. *Lyon Med* 229: 1215. In: Scriver CH, Beaudet A, Sly W, Valle D (orgs) *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease* (2001). Editora McGraw-Hill, New York, pp 3695-3724.

Gustavson KH and Hagberg B (1971) The incidence and genetics of metachromatic leucodystrophy in northern Sweden. *Acta Paediatr Scand* 60:585-590.

Haberlandt E, Scholl-Bürgi S, Neuberger J, Felber S, Gotwald T, Sauter R, Rostasy K, Karall D, Korinthenberg R (2008) Peripheral neuropathy as the sole

initial finding in three children with infantile metachromatic leukodystrophy. *Eur J Paediatr Neurol*. 2008 Jun 19. [Epub ahead of print] PMID: 18571943

Halsall DJ, Halligan EP, Elsey TS, Cox TM (1999) Metachromatic leucodystrophy: a newly identified mutation in arylsulphatase A, D281Y, found as a compound heterozygote with I179L in an adult onset case. *Hum Mutat* 14:447.

Haltia T, Palo J, Haltia M and Icen A (1980) Juvenile metachromatic leukodystrophy: clinical, biochemical, and neuropathologic studies in nine new cases. *Arch Neurol* 37:42-46.

Hahn AF, Gordon BA, Hinton GG, Gilbert JJ (1982) A variant form of metachromatic leukodystrophy without arylsulfatase deficiency. *Ann Neurol* 12:33-36.

Heim P, Claussen M, Hoffmann B, Conzelmann E, Gärtner J and Harzer K (1997) Leukodystrophy incidence in Germany. *Am J Med Genet* 71: 475-478.

HGMD. Human Gene Mutation Database. <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php> . Acessado dia 13 de fevereiro de 2009.

Holve S, Hu D and McCandless SE (2001) Metachromatic leukodystrophy in the Navajo: fallout of the American-Indian wars of the nineteenth century. *Am J Med Genet* 101:203-208.

Honke K, Taniguchi N (2002) Sulfotransferases and sulfated oligosaccharides. *Med Res Rev* 22:637-654.

Inui K, Wenger DA (1984) Biochemical, immunological, and structural studies on a sphingolipid activator protein (SAP-1). *Arch Biochem Biophys* 233:556-564.

Jatzkewitz H and Mehl E (1959) Cerebroside-sulphatase and aryl sulfatase A deficiency in metachromatic leukodystrophy. *J Neurochem* 16:19.

Kawabata K, Migita M, Mochizuki H, Miyake K, Igarashi T, Fukunaga Y and Shimada T (2006) Ex vivo cell-mediated gene therapy for metachromatic leukodystrophy using neurospheres. *Brain Res* 13;1094:13-23.

Kozlowski K, Basel D, Beighton P (2006) Retrospective diagnosis of chondrodysplasia punctata. *Australas Radiol* 50:55-58.

Krivit W, Aubourg P, Shapiro E and Peters C (1999) Bone marrow transplantation for globoid cell leukodystrophy, adrenoleukodystrophy, metachromatic leukodystrophy and Hurler syndrome. *Curr Opin Hematol* 6:377-382.

Kruse B, Hanefeld F, Christen HJ, Bruhn H, Michaelis T, Hänicke W, Frahm J (1993) Alterations of brain metabolites in metachromatic leukodystrophy as

detected by localized proton magnetic resonance spectroscopy in vivo. *J Neurol* 241:68-74.

Lagranha VL, Baldo G, de Carvalho TG, Burin M, Saraiva-Pereira ML, Matte U, Giugliani R (2008) In vitro correction of ARSA deficiency in human skin fibroblasts from metachromatic leukodystrophy patients after treatment with microencapsulated recombinant cells. *Metab Brain Dis* 23:469-484.

Laidler MP, Waheed A and van Etten LR (1985) Structural and immunochemical characterization of human urine arylsulfatase A purified by affinity chromatography. *Biochem Biophys Acta* 827:73-83.

Lee-Vaupel M and Conzelmann E (1987) A simple chromogenic assay for arylsulfatase A. *Clin Chim Acta* 164: 171-180.

Lugowska A, Berger J, Tylki-Szymanska A, Czartoryska B, Loschl B, Molzer B (2002) High prevalence of I179S mutation in patients with late-onset metachromatic leukodystrophy. *Clin Genet* 61: 389-390.

Lukatela G, Krauss N, Theis K, Selmer T, Gieselmann V, von Figura K, Saenger W (1998) Crystal structure of human arylsulfatase A: the aldehyde function and the metal ion at the active site suggest a novel mechanism for sulfate ester hydrolysis. *Biochemistry* 37:3654-3664.

Mabe-Santana P (2006) La enfermedad de Krabbe y la leucodistrofia metacromática. In: Sanjurjo P and Baldellou A (orgs) *Diagnóstico y tratamiento de las enfermedades metabólicas hereditarias* (2006). Editora Ergon, Madrid, pp 639-650.

MacFaul R, Cavanagh N, Lake BD, Stephens R and Whitfield AE (1982) Metachromatic leucodystrophy: review of 38 cases. *Arch Dis Child* 57:168-175.

Malm G, Ringdén O, Winiarski J, Gröndahl E, Uyebrant P, Eriksson U, Håkansson H, Skjeldal O and Månsson JE (1996) Clinical outcome in four children with metachromatic leukodystrophy treated by bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 17:1003-1008.

Marcão AM, Wiest R, Schindler K, Wiesmann U, Weis J, Schroth G, Miranda MC, Sturzenegger M, Gieselmann V (2005) Adult onset metachromatic leukodystrophy without electroclinical peripheral nervous system involvement: a new mutation in the ARSA gene. *Arch Neurol* 62:309-313.

Marcão A, Amaral O, Pinto E, Pinto R, Sá Miranda MC (1999) Metachromatic leucodystrophy in Portugal-finding of four new molecular lesions: C300F, P425T, g.1190-1191insC, and g.2408delC. *Mutations in brief* no. 232. Online. *Hum Mutat* 13:337-338.

Martin PL, Carter SL, Kernan NA, Sahdev I, Wall D, Pietryga D, Wagner JE and Kurtzberg J (2006) Results of the cord blood transplantation study (COBLT): outcomes of unrelated donor umbilical cord blood transplantation in pediatric patients with lysosomal and peroxisomal storage diseases. *Biol Blood Marrow Transplant* 12:184-194.

Martin HP, Poe MD, Szabolcs P, Martin P, Subag P, Vinod P et al (2007) Neurodevelopmental outcomes of unrelated umbilical cord transplantation for metachromatic leukodystrophy. *Biol Blood Marrow Transplant* 13 (Suppl S): 63, abstract 168.

Martino S, Consiglio A, Cavalieri C, Tiribuzi R, Costanzi E, Severini GM, Emiliani C, Bordignon C, Orlicchio A (2005) Expression and purification of a human, soluble Arylsulfatase A for Metachromatic Leukodystrophy enzyme replacement therapy. *J Biotechnol* 25;117:243-251.

Mattioli C, Gemma M, Baldoli C, Sessa M, Albertin A, Beretta L (2007) Sedation for children with metachromatic leukodystrophy undergoing MRI. *Paediatr Anaesth* 17:64-69.

Matzner U, Harzer K, Learish RD, Barranger JA and Gieselmann V (2000) Long-term expression and transfer of arylsulfatase A into brain of arylsulfatase A-deficient mice transplanted with bone marrow expressing the arylsulfatase A cDNA from a retroviral vector. *Gene Ther* 7:1250-1257.

Matzner U and Gieselmann V (2005) Gene therapy of metachromatic leukodystrophy. *Expert Opin Biol Ther* 5:55-65.

Matzner U, Matthes F, Weigelt C, Andersson C, Eistrup C, Fogh J, Gieselmann V (2008) Non-inhibitory antibodies impede lysosomal storage reduction during enzyme replacement therapy of a lysosomal storage disease. *J Mol Med* 86:433-442.

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

Nardi NB, Teixeira LAK and Silva EFA (2002) Terapia gênica. *Ciência & Saúde Coletiva* 7: 109-116.

Nelson PV, Carey WF and Morris CP (1991) Population frequency of the arylsulphatase A pseudo-deficiency allele. *Hum Genet* 87:87-88.

Official Web Site of Phelan-McDermid Syndrome and 22q13 Deletion Foundation. ([www.22q13.org](http://www.22q13.org)) Acessado dia 22 de março de 2009.

Orchard PJ, Blazar BR, Wagner J, Charnas L, Krivit W, Tolar J (2007) Hematopoietic cell therapy for metabolic disease. *J Pediatr* 151:340-346.

Ott R, Waye JS, Chang PL (1997) Evolutionary origins of two tightly linked mutations in arylsulfatase-A pseudodeficiency. *Hum Genet* 101:135-140.

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

Patel MS, Callahan JW, Zhang S, Chan AK, Unger S, Levin AV, Skomorowski MA, Feigenbaum AS, O'Brien K, Hellmann J, Ryan G, Velsher L, Chitayat D (1999) Early-infantile galactosialidosis: prenatal presentation and postnatal follow-up. *Am J Med Genet* 85:38-47.

Pedron CG, Gaspar PA, Giugliani R and Pereira ML (1999) Arylsulfatase A pseudodeficiency in healthy Brazilian individuals. *Braz J Med Biol Res* 32: 941-945.

Pereira MLS (1994) Molecular and biochemical characterization of defects in the arylsulphatase A gene. Division of Medical and Molecular Genetics. United Medical and Dental Schools of Guy's and St Thomas' Hospital. Tese de doutorado, Universidade de Londres, Inglaterra.

Pfeifer J (1959) Über die metachromatischen Leukodystrophien (Typ Scholz). *Arch Psychiatr Nervenkr* 199:386. In: Scriver CH, Beaudet A, Sly W, Valle D (orgs) *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease* (2001). Editora McGraw-Hill, New York, pp 3695-3724.

Phelan MC (2008) Deletion 22q13.3 syndrome. *Orphanet J Rare Dis* 27:14.

Philippe A, Boddaert N, Vaivre-Douret L, Robel L, Danon-Boileau L, Malan V, de Blois MC, Heron D, Colleaux L, Golse B, Zilbovicius M, Munnich A (2008) Neurobehavioral profile and brain imaging study of the 22q13.3 deletion syndrome in childhood. *Pediatrics* 122:e376-382.

Pinto R, Caseiro C, Lemos M, Lopes L, Fontes A, Ribeiro H, Pinto E, Silva E, Rocha S, Marcão A, Ribeiro I, Lacerda L, Ribeiro G, Amaral O, Sá Miranda MC (2004) Prevalence of lysosomal storage diseases in Portugal. *Eur J Hum Genet* 12:87-92.

Polten A, Fluharty A, Fluharty CB, Kappler J, von Figura K, Gieselmann V (1991) Molecular basis of different forms of metachromatic leukodystrophy. *New Eng. J Med* 324: 18-22.

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

Rafi MA, Coppola S, Liu SL, Rao HZ, Wenger DA (2003) Disease-causing mutations in *cis* with the common arylsulfatase A pseudodeficiency allele

compound the difficulties in accurately identifying patients and carriers of metachromatic leukodystrophy. *Mol Genet Metab* 79:83-90.

Rauschka H, Colsch B, Baumann N, Wevers R, Schmidbauer M, Krammer M, Turpin JC, Lefevre M, Olivier C, Tardieu S, Krivit W, Moser H, Moser A, Gieselmann V, Zalc B, Cox T, Reuner U, Tytki-Szymanska A, Aboul-Enein F, LeGuern E, Bernheimer H, Berger J (2006) Late-onset metachromatic leukodystrophy: genotype strongly influences phenotype. *Neurology* 67:859-863.

Regis S, Filocamo M, Stroppiano M, Corsolini F, Gatti R (1996) Molecular analysis of the arylsulphatase A gene in late infantile metachromatic leukodystrophy patients and healthy subjects from Italy. *J Med Genet* 33:251-252.

Rohrbach M, Clarke JT (2007) Treatment of lysosomal storage disorders: progress with enzyme replacement therapy. *Drugs* 67:2697-2716.

Sandberg S, Charnas L, Braunlin E, Bjoraker K, Deanching M, Hoganson G, Rimell R, Whitley C (2007) Treatment of multiple sulfatase deficiency with recombinant human arylsulfatase B. *Mol Genet Metab* 92:31.

Sandhoff K (2001) The GM2-gangliosidoses and the elucidation of the beta-hexosaminidase system. *Adv Genet* 44:67-91.

Schipper HI and Seidel D (1984) Computed tomography in late-onset metachromatic leukodystrophy. *Neuroradiology* 26:39-44.

Schmidt B, Selmer T, Ingendoh A and von Figura K (1995) A novel amino acid modification in sulfatases that is defective in multiple sulfatase deficiency. *Cell* 82:271-278.

Schmidt H, Kern W, Giese R, Hallschmid M, Enders A (2008) Intranasal insulin to improve the developmental delay in children with 22q13 deletion syndrome: an exploratory clinical trial. *J Med Genet* 2008 Oct 23. [Epub ahead of print] PMID: 18948358

Scholz W (1925) Klinische, pathologisch-anatomische und erbbiologische. Untersuchungen bei familiärer, diffuser Hirnsklerose im Kindesalter. *Z Gesamte Neurol/Psychiatr* 99:42. In: Scriver CH, Beaudet A, Sly W, Valle D (orgs) *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease* (2001). Editora McGraw-Hill, New York, pp 3695-3724.

Seidel D, Heipertz R, Goebel HH, Duensing I and Pilz H (1980) Adult metachromatic leukodystrophy: clinical course, final stages and first biochemical. *Eur Neurol* 19:288-293.

Sevin C, Aubourg P, Cartier N (2007) Enzyme, cell and gene-based therapies for metachromatic leukodystrophy. *J Inherit Metab Dis* 30:175-183.

Shapiro LJ, Aleck KA, Kaback MM, Itabashi H, Desnick RJ, Brand N, Stevens RL, Fluharty AL and Kihara H (1979) Metachromatic leukodystrophy without arylsulfatase A deficiency. *Pediatr Res* 13:1179-1181.

Shen N, Li ZG, Waye JS, Francis G, Chang PL (1993). Complications in the genotypic molecular diagnosis of pseudo arylsulfatase A deficiency. *Am J Med Genet* 45:631-637.

Schuetz CG, Pierstorff B, Huettler S, Sandhoff K (2001) Sphingolipid activator proteins: proteins with complex functions in lipid degradation and skin biogenesis. *Glycobiology* 11:81R-90R.

Stein C, Gieselmann V, Kreysing J, Schmidt B, Pohlmann R, Waheed A, Meyer HE, O'Brien JS and von Figura K (1989) Cloning and expression of human arylsulfatase A. *J Biol Chem* 264:1252-1259.

Stevens RL, Fluharty AL, Kihara H, Kaback MM, Shapiro LJ, Marsh B, Sandhoff K, Fischer G (1981) Cerebroside sulfatase activator deficiency induced metachromatic leukodystrophy. *Am J Hum Genet* 33(6):900-906.

Tabardel Y, Soyeur D, Vivario E, Senterre J (1989) Primary neuraminidase deficiency with prenatal disclosure. *Arch Fr Pediatr* 46:737-740.

Tagaya M, Mizuno S, Hayakawa M, Yokotsuka T, Shimizu S, Fujimaki H (2008) Recombination of a maternal pericentric inversion results in 22q13 deletion syndrome. *Clin Dysmorphol* 17:19-21.

Taybi H, Lachmann RS (1996). In: *Radiology of syndromes, metabolic disorders, and skeletal dysplasias*. Fourth Edition. Editora Mosby-Year Book Inc, New York, pp 385.

Universidade de São Francisco. ([http://missinglink.ucsf.edu/lm/ids\\_104\\_Demyelination/Didactic/Leukodystrophies.htm](http://missinglink.ucsf.edu/lm/ids_104_Demyelination/Didactic/Leukodystrophies.htm)). Acessado no dia 13 de março de 2009.

van der Knaap MS and Valk J (2005) Metachromatic Leukodystrophy. In: *Magnetic Resonance of Myelination and Myelin Disorders*. Third Edition. Editora Springer, New York, pp 74-81.

van der Voorn JP, Kamphorst W, van der Knaap MS, Powers JM (2004) The leukoencephalopathy of infantile GM1 gangliosidosis: oligodendrocytic loss and axonal dysfunction. *Acta Neuropathol* 107:539-545.

von Figura K, Gieselmann V, Jaeken J (2001) Methacromatic Leukodystrophy. In: Scriver CH, Beaudet A, Sly W and Valle D (orgs) *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease* (2001). Editora McGraw-Hill, New York, pp 3695-3724.

Waheed A, Hasilik A and von Figura K (1982) Synthesis and processing of arylsulfatase A in human skin fibroblasts. *Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem* 363: 425-430.

Wilson HL, Crolla JA, Walker D, Artifoni L, Dallapiccola B, Takano T, Vasudevan P, Huang S, Maloney V, Yobb T, Quarrell O, McDermid HE (2008) Interstitial 22q13 deletions: genes other than SHANK3 have major effects on cognitive and language development. *Eur J Hum Genet* 16:1301-1310.

Yiş U, Pepe S, Kurul SH, Ballabio A, Cosma MP, Dirik E (2008) Multiple sulfatase deficiency in a Turkish family resulting from a novel mutation. *Brain Dev* 30:374-377.

Zeng Y, Cheng H, Jiang X, Han X (2008) Endosomes and lysosomes play distinct roles in sulfatide-induced neuroblastoma apoptosis: potential mechanisms contributing to abnormal sulfatide metabolism in related neuronal diseases. *Biochem J* 410:81-92.

Zlotogora J, Bach G, Barak V and Elian E (1980) Metachromatic leukodystrophy in the habbanite Jews: high frequency in a genetic isolate and screening for heterozygotes. *Am J Hum Genet* 32:663-669.

## **ANEXOS**

## Ficha de avaliação clínica

Projeto **LEUCODISTROFIA METACROMÁTICA: CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA, BIOQUÍMICA E EPIDEMIOLÓGICA DE PACIENTES BRASILEIROS**

Ficha LREIM/ONG PELA VIDA número: \_\_\_\_\_

Paciente: \_\_\_\_\_

Data de nascimento: \_\_/\_\_/\_\_

Data de preenchimento: \_\_/\_\_/\_\_

Sexo: ( ) masculino

( ) feminino

Naturalidade: \_\_\_\_\_

Médico assistente: \_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Dados do nascimento:

- tipo de parto: \_\_\_\_\_

- peso: \_\_\_\_\_

- comprimento: \_\_\_\_\_

- perímetro cefálico: \_\_\_\_\_

- outros: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

História familiar (construir heredograma no verso):

- Consangüinidade parental: ( ) sim ( ) não ( ) não informada

- Outros afetados na família?

( ) Sim. Número e grau parentesco: \_\_\_\_\_

( ) Não

( ) Não informado

Idade de início da sintomatologia: \_\_\_\_\_

Manifestações clínicas iniciais:

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

<b>Desenvolvimento neuropsicomotor</b>	<b>Idade de aquisição</b>	<b>Idade de perda</b>
Sustento cefálico		
Sentar sem apoio		
Caminhar sem apoio		
Controle esfíncter vesical (diurno e noturno)		
Controle esfíncter anal (diurno e noturno)		
Palavras com no mínimo duas sílabas		
Formar frases		

Escolaridade: \_\_\_\_\_

Internações hospitalares (data, motivo): \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Procedimentos cirúrgicos (data, procedimento, intercorrências): \_\_\_\_\_

---

---

---

---

Tem ou teve crises convulsivas? \_\_\_\_\_

Idade do primeiro episódio: \_\_\_\_\_

Fez avaliação oftalmológica? Resultados: \_\_\_\_\_

---

---

---

---

Fez avaliação neurológica? Resultados: \_\_\_\_\_

---

---

---

---

Fez avaliação para transplante de medula óssea? Resultados: \_\_\_\_\_

---

---

---

---

Faz uso de alguma medicação? Qual? \_\_\_\_\_

---

---

---

---

Último exame físico:

- data: \_\_\_\_\_

- idade: \_\_\_\_\_
- peso: \_\_\_\_\_
- comprimento: \_\_\_\_\_
- perímetro cefálico: \_\_\_\_\_
- Desenvolvimento neuropsicomotor: \_\_\_\_\_

---



---



---

- Cognição: \_\_\_\_\_

---



---



---

**Exame Físico:**

Realizado quando possível a avaliação do paciente, ou preenchido pelo seu médico assistente

<b>Sinais e Sintomas</b>	<b>Grau</b>	<b>Data de início</b>	<b>Observações</b>
Ataxia de marcha			
Ataxia de membros			
Sinais piramidais			
Distonia			
Rigidez/bradicinesia			
Nistagmo/oftalmoplegia			
Atrofia óptica			
Disartria			
Disfagia			
Sensibilidade			
Força			
Trofismo muscular			

Outras informações sobre exames complementares:

- Exame de imagem do sistema nervoso central (tomografia computadorizada e/ou ressonância nuclear magnética): \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

- Eletroneuromiografia:

ENMG			Potencial Motor				Potencial Sensitivo		
Data	Local	Membro Pesquisado	Latência	Amplitude	Duração	Velocidade de Condução	Latência distal	Duração	Amplitude

- Potencial Evocado Auditivo: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

- Potencial Evocado Visual: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

- Outros: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Data de início da investigação bioquímica: \_\_\_\_\_

Data do diagnóstico laboratorial de LM: \_\_\_\_\_

Óbito: ( ) sim. Idade: \_\_\_\_\_

Causa: \_\_\_\_\_

( ) não

Investigação laboratorial realizada (plasma/leucócitos/fibroblastos):

Exames realizados:

Data	Atividade enzima	Tecido	Valor encontrado	Valor de referência
	Arilsulfatase A			
	Quitotriosidase			

Exames realizados (urina):

Data	Exame	Valor encontrado	Valor normal
	Cromatografia de sulfatídeos		
	Cromatografia de sialo-oligossacarídeos		

Genótipo (gene *ARSA*): ( ) sim. Qual? \_\_\_\_\_

( ) não

CONCLUSÃO:

( ) Leucodistrofia Metacromática

( ) Pseudodeficiência de arilsulfatase A

( ) Deficiência múltipla de sulfatase

( ) Deficiência de Saposina B

( ) Outro: \_\_\_\_\_

## Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Anexo I – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido  
TERMO DE CONSENTIMENTO PÓS-INFORMAÇÃO

Projeto: **LEUCODISTROFIA METACROMÁTICA: CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA, BIOQUÍMICA E EPIDEMIOLÓGICA DE PACIENTES BRASILEIROS DIAGNOSTICADOS EM UM CENTRO DE REFERÊNCIA NACIONAL**

Investigadores Responsáveis: Osvaldo Alfonso Pinto Artigalás e Profa. Dra. Ida Vanessa D. Schwartz. Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Avenida Bento Gonçalves 9500, Porto Alegre-RS. Tel: 51-33086722.

Paciente: \_\_\_\_\_

Prezado paciente ou responsável,

Esta pesquisa tem por objetivo a obtenção de informações relativas aos sintomas de pessoas com Leucodistrofia Metacromática ou com suspeita de terem Leucodistrofia Metacromática e às alterações presentes em suas enzimas. Estas informações serão obtidas por meio de entrevistas com você e/ou com os seus médicos, e mediante consulta a seu prontuário.

Caso as medidas das atividades enzimáticas que podem estar alteradas na Leucodistrofia Metacromática não tenham sido ainda realizadas em você, será necessário que você (paciente) seja submetido à coleta de sangue (10 mL para a análise da enzima que podem estar alterada em sangue) e realização de biópsia de pele (para a análise da enzima na pele). Caso a análise do gene envolvido na Leucodistrofia Metacromática não tenha ainda sido realizada em você (paciente), também será necessária a coleta adicional de 5 mL de sangue. Se a análise da substância que se acumula na Leucodistrofia Metacromática ainda não foi avaliada será necessária a coleta de 30 mL de urina. Você pode concordar ou não com a realização destes exames. Os riscos e desconfortos causados pela coleta de sangue são semelhantes aos riscos envolvidos na coleta de sangue para exames laboratoriais de rotina (manchas roxas e dor no local da coleta). A biópsia

HCPA / CPPG  
VERSÃO APROVADA  
11.02.2008  
M 07599

G P P G - Recebido

08 FEV. 2008

Por Janice nº 07599

31

de pele deverá ser realizada em condições higiênicas e sob anestesia local; o fragmento a ser retirado é pequeno (em torno de 0,3 cm) e superficial, não sendo, portanto, necessária à realização de pontos. O desconforto e os riscos associados a estas avaliações serão minimizados pela realização da coleta por profissional treinado. Se você permitir, o material coletado, e que restar após a realização dos exames previstos neste estudo, será armazenado e utilizado em estudos futuros. Em relação a estas coletas, você declara que autorizou a coleta de (marcar com um X):

- 5 mL de sangue para a análise do gene envolvido na Leucodistrofia Metacromática
- 10 mL de sangue para a análise da enzima
- biópsia de pele para análise da enzima
- 30 mL de urina para cromatografia de sulfatídeos
- eu não autorizei nenhuma das coletas acima relacionadas

Em relação ao armazenamento e utilização de algum material (sangue ou pele) que tenha restado após a realização dos exames previstos neste estudo, você declara que autorizou (marcar com um X):

- que este material poderá ser armazenado e poderá vir a ser utilizado em estudos futuros; desde que você revise e assine o termo de consentimento de tais estudos futuros.
- que este material não poderá ser armazenado e não poderá vir a ser utilizado em estudos futuros. O material coletado deverá ser utilizado somente neste estudo, e o material que sobrar não deverá ser armazenado.

Cabe salientar que a Leucodistrofia Metacromática não possui, ainda, tratamento eficaz, e que esta pesquisa não tem como finalidade imediata a garantia de uma melhora para os pacientes. Pode, entretanto, contribuir para um melhor entendimento desta doença, o qual, no futuro, pode levar ao desenvolvimento de uma terapia mais efetiva. A identificação das mutações (alterações do DNA) presentes no gene que ocasiona esta doença poderá ser importante para o aconselhamento genético da sua família e para o diagnóstico pré-natal. Não existe um prazo exato ou estipulado para que você receba os

HCPA / GPPG  
VERSÃO APROVADA

11.02.2008  
WL 07599

32

resultados dos exames realizados nesta pesquisa, mas estes lhes serão informados assim que estiverem disponíveis. Você pode optar por não saber o resultado dos testes quando estes estiverem disponíveis.

#### **DÚVIDAS**

Se você tiver alguma dúvida em relação à pesquisa, deve contatar a Osvaldo Alfonso P. Artigalás ou a Profa. Dra. Ida Vanessa D. Schwartz, no Departamento de Genética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul ou no Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

#### **AUTORIZAÇÃO PARA PERMITIR PESQUISA DOS REGISTROS MÉDICOS**

Você tem direito à privacidade. Os resultados deste estudo poderão ser publicados, mas o seu nome não será revelado e todo esforço será feito que a sua identidade não seja revelada. Por meio deste termo, você autoriza que os pesquisadores envolvidos neste estudo pesquisem os seus registros médicos a fim de obter as informações necessárias para a realização desta pesquisa.

#### **RECUSA OU DESCONTINUAÇÃO NA PARTICIPAÇÃO DO ESTUDO**

Sua participação no estudo é voluntária. Se você decidir não participar do estudo, isto não afetará em nada o seu tratamento no seu hospital. A sua participação pode também ser interrompida a qualquer momento por você mesmo (a). Em qualquer caso, você não será penalizado (a).

Pelo presente termo, você declara que foi informado (a), de forma clara e detalhada, sobre a presente pesquisa, e que teve suas dúvidas esclarecidas por \_\_\_\_\_ . Declara ter sido esclarecido que não receberá nenhuma remuneração financeira pela participação no estudo. Declara que foi informado da garantia de receber resposta ou esclarecimento sobre a pesquisa a ser realizada, bem como da liberdade de não participar do

HCFA / GPPG  
VERSÃO APROVADA

11/02/2008  
MK 07599

33

**Tabela 1. Descrição sumarizada das principais variáveis descritas nos 29 pacientes com LDM**

Parte I

Paciente	Sexo	Idade (meses)	Idade Início Sintomas (meses)	Idade da Confirmação Bioquímica (meses)	Forma Clínica	Manifestações Clínicas Iniciais	Atividade da ARSA (nmol/h/mg prot) VR: 5-20
1	F	44	15	33	Infantil tardia	Alteração da marcha, quedas freqüentes	0,50
2	F	291	192	241	Adulta	Alteração comportamental e cognitiva	0,30
3	M	NC	12	48	Infantil tardia	Atraso no DNPM	0,90
4	F	60	22	34	Infantil tardia	Alteração da marcha, hipotonia, tremores, perda de força	0,50
5	M	152	108	139	Juvenil	Alteração da marcha, hipotonia, tremores, perda de força	0,60
6	F	110	Assintomática	101	Assintomático	Assintomático	1,00
7	M	41	10	39	Infantil tardia	Alteração da marcha	0,50
8	M	126	11	37	Infantil tardia	Alteração cognitiva e de marcha, quedas freqüentes	0,61
9	F	79	15	28	Infantil tardia	Alteração da marcha	0,30
10	M	84	14	28	Infantil tardia	Alteração da marcha	0,10
11	M	20	16	NC	Infantil tardia	Alteração da marcha	0,30
12	M	336	96	331	Juvenil	Alteração Cognitiva	0,70
13	M	55	36	47	Infantil tardia	Alteração da marcha	1,00
14	F	37	20	24	Infantil tardia	Alteração da marcha	0,80
15	M	26	19	20	Infantil tardia	Alteração da marcha	0,00
16	F	92	18	51	Infantil tardia	Atraso no DNPM	0,60
17	F	38	33	34	Infantil tardia	Atraso no DNPM	1,00
18	F	57	12	34	Infantil tardia	Atraso no DNPM	1,00
19	F	162	18	25	Infantil tardia	Atraso no DNPM	0,44
20	M	259	60	96	Juvenil	Alteração da marcha	0,40
21	M	32	17	30	Infantil tardia	Alteração da marcha	0,20
22	M	92	18	58	Infantil tardia	Alteração da marcha	0,15
23	F	83	28	61	Infantil tardia	Alteração da marcha, hipotonia, tremores, perda de força	0,80
24	F	195	75	79	Juvenil	Alteração cognitiva e da marcha, quedas frequentes	0,39
25	M	106	18	89	Infantil tardia	Alteração da marcha, atraso no DNPM, hipotonia, tremores, perda de força	0,30
26	M	75	12	29	Infantil tardia	Atraso no DNPM	1,80
27	M	139	43	NC	Infantil tardia	Alteração de marcha e comportamental	1,60
28	M	43	Assintomático	4	Assintomático	Assintomático	0,90
29	M	49	12	32	Infantil tardia	Alteração da marcha, quedas frequentes	1,70

M: masculino; F: feminino; NC: não completou; DNPM: desenvolvimento neuropsicomotor.

**Tabela 1. Descrição sumarizada das principais variáveis descritas nos 29 pacientes com LDM**

Parte II

Paciente	Avaliação neurológica	Desenvolvimento Neuropsicomotor	Eletroneuromiografia	Imagem SNC	Convulsões	Medicação em uso
1	Apresenta convulsões	Sem sustento cefálico e sem contato visual	Não realizou	Alteração de substância branca, difusa	Não	Anticonvulsivantes
2	Normal	NC	Não realizou	Alteração de substância branca, periventricular	Sim	Anticonvulsivantes, analgésicos, antipsicóticos e vitaminas
3	Presença de sinais piramidais	Sem sustento cefálico e restrito ao leito	Polineuropatia SM	Atrofia cerebral eou dilatação ventricular	Sim	Analgésicos e vitaminas
4	Outros	Sem comunicação verbal, sem contato visual e com déficit cognitivo	Polineuropatia SM	Alteração de substância branca, difusa	Sim	Anticonvulsivantes, relaxantes musculares e drogas anti-RGE
5	Presença de sinais piramidais e com alterações cognitivas e comportamentais	NC	Polineuropatia SM	Alteração de substância branca, periventricular	Sim	NC
6	Normal	Sem comunicação verbal, sem contato visual e com déficit cognitivo	Não realizou	Alteração de substância branca, periventricular	Não	Sem uso atual de medicação
7	Presença de sinais piramidais	Sem sustento cefálico e comunicação verbal	Polineuropatia SM	Alteração de substância branca, difusa	Não	Sem uso atual de medicação
8	Apresenta convulsões	Sem sustento cefálico, sem comunicação verbal e restrito ao leito	Polineuropatia SM	Alteração de substância branca, periventricular	Sim	Antibióticos
9	Apresenta convulsões e com alterações cognitivas e comportamentais	Sem sustento cefálico, sem comunicação verbal e restrito ao leito	Polineuropatia SM	Alteração de substância branca, difusa	Não	Sem uso atual de medicação

NC: não completou; RGE: refluxo gastro-esofágico; SM: sensitivo-motora

Parte II: continuação

Paciente	Avaliação neurológica	Desenvolvimento Neuropsicomotor	Eletroneuromiografia	Imagem SNC	Convulsões	Medicação em uso
10	Alterações motoras	NC	NC	Alteração de substância branca, difusa, parieto-occipital e em núcleos de base	Não	NC
11	Alterações motoras	Sem deambulação independente e com disfagia	Redução da velocidade de condução, inespecífica	Normal	Não	Sem uso atual de medicação
12	Apresenta convulsões e com alterações cognitivas e comportamentais	NC	NC	NC	Sim	NC
13	Alterações cognitivas e comportamentais, alterações motoras	NC	Polineuropatia SM	Alteração de substância branca, difusa	Sim	Anticonvulsivantes
14	Espasticidade	Sem sustento cefálico, sem contato visual e restrito ao leito	Não realizou	Alteração de substância branca, difusa	Sim	Anticonvulsivantes
15	Presença de sinais piramidais, com alterações cognitivas e comportamentais, alterações motoras	Sem deambulação independente	Não realizou	Alteração de substância branca, periventricular	Não	Sem uso atual de medicação
16	Espasticidade e alterações motoras	Sem contato visual e restrito ao leito	Normal	Atrofia cerebral e/ou dilatação ventricular	Sim	Anticonvulsivantes
17	Espasticidade	Sem comunicação verbal e sem deambulação independente	NC	Alteração de substância branca, difusa	Não	Sem uso atual de medicação
18	Espasticidade	Sem sustento cefálico ou incompleto	Redução da velocidade de condução, inespecífica	Alteração de substância branca, difusa	Não	Drogas anti-RGE
19	Espasticidade	Com disfagia	Polineuropatia SM	Atrofia cerebral e/ou dilatação ventricular	Sim	Anticonvulsivantes, relaxantes musculares
20	Espasticidade, presença de sinais piramidais com alterações cognitivas e comportamentais	Déficit cognitivo e com disfagia	Polineuropatia SM	Alteração de substância branca, periventricular e em núcleos de base	Não	Anticonvulsivantes, relaxantes musculares

NC: não completou; RGE: refluxo gastro-esofágico; SM: sensitivo-motora

Parte II: continuação

Paciente	Avaliação neurológica	Desenvolvimento Neuropsicomotor	Eletroneuromiografia	Imagem SNC	Convulsões	Medicação em uso
21	Espasticidade e presença de sinais piramidais	Sem sustento cefálico, sem comunicação verbal e sem deambulação independente	Não realizou	Alteração de substância branca, parieto-occipital	Sim	Anticonvulsivantes
22	Outros	Sem deambulação independente	Não realizou	Alteração de substância branca, difusa e infra-tentorial e/ou cerebelar	Sim	Anticonvulsivantes
23	Espasticidade e presença de sinais piramidais	NC	Polineuropatia SM	NC	Não	Relaxantes musculares e drogas anti-RGE
24	Normal	Restrita ao leito	Polineuropatia SM	Alteração de substância branca, periventricular e em núcleos de base	Sim	Anticonvulsivantes, analgésicos, antipsicóticos e vitaminas
25	Espasticidade e presença de sinais piramidais	NC	Polineuropatia SM	Alteração de substância branca, difusa	Não	Relaxantes musculares, analgésicos e vitaminas
26	NC	Sem deambulação independente e com disfagia	Redução da velocidade de condução, inespecífica	Alteração de substância branca, difusa e atrofia cerebral e/ou dilatação ventricular	Não	Analgésicos e vitaminas
27	Espasticidade e alterações motoras	Restrita ao leito	Não realizou	Alteração de substância branca, infra-tentorial e/ou cerebelar	Não	Anticonvulsivantes, analgésicos e vitaminas
28	Normal	Sem comunicação verbal e sem deambulação independente	Não realizou	Normal	Não	Sem uso atual de medicação
29	Espasticidade, presença de sinais piramidais e alterações motoras	Sem deambulação independente e com disfagia	Não realizou	Alteração de substância branca, difusa	Sim	Anticonvulsivantes, analgésicos, drogas anti-RGE e vitaminas

NC: não completou; RGE: refluxo gastro-esofágico; SM: sensitivo-motora

## Aprovação do projeto de pesquisa junto ao Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre



### HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação COMISSÃO CIENTÍFICA E COMISSÃO DE PESQUISA E ÉTICA EM SAÚDE

A Comissão Científica e a Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde, que é reconhecida pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP)/MS como Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA e pelo Office For Human Research Protections (OHRP)/USDHHS, como Institutional Review Board (IRB0000921) analisaram o projeto:

**Projeto:** 07-599      **Versão do Projeto:** 01/02/2008      **Versão do TCLE:** 08/02/2008

**Pesquisadores:**

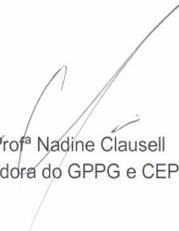
IDA VANESSA DOEDERLEIN SCHWARTZ  
ROBERTO GIUGLIANI  
MARIA LUIZA SARAIVA PEREIRA  
URSULA DA SILVEIRA MATTE  
OSVALDO ALFONSO PINTO ARTIGALAS  
MAIRA GRAEFF BURIN

**Título:** LEUCODISTROFIA METACROMÁTICA: CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA, BIOQUÍMICA E EPIDEMIOLÓGICA DE PACIENTES BRASILEIROS DIGNOSTICADOS EM UM CENTRO DE REFERÊNCIA NACIONAL

- Este projeto foi Aprovado em seus aspectos éticos e metodológicos, inclusive quanto ao seu Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, de acordo com as Diretrizes e Normas Internacionais e Nacionais, especialmente as Resoluções 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde. Os membros do CEP/HCPA não participaram do processo de avaliação dos projetos onde constam como pesquisadores. Toda e qualquer alteração do Projeto, assim como os eventos adversos graves, deverão ser comunicados imediatamente ao CEP/HCPA. Somente poderão ser utilizados os Termos de Consentimento onde conste a aprovação do GPPG/HCPA.

- De acordo com a regulamentação da Resolução 340/2004 do CNS/MS o CEP/HCPA foi credenciado, através da Carta Circular N° 037 CONEP/CNS/MS de 11 de agosto de 2004, para dar aprovação final para este projeto.

Porto Alegre, 11 de fevereiro de 2008.

  
Profª Nadine Clausell  
Coordenadora do GPPG e CEP-HCPA