

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

ALINE NEMETZ BOCHERNITSAN

**Distribuição geográfica da Mucopolissacaridose tipo VI no Brasil
através de estudos moleculares para identificação de mutações
patogênicas e polimorfismos no gene *ARSB***

Porto Alegre

2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

ALINE NEMETZ BOCHERNITSAN

**Distribuição geográfica da Mucopolissacaridose tipo VI no Brasil
através de estudos moleculares para identificação de mutações
patogênicas e polimorfismos no gene *ARSB***

Trabalho de conclusão de curso de graduação
como requisito parcial para obtenção do grau de
bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Dr. Roberto Giugliani

Co-orientadora: Dra. Sandra Leistner-Segal

Porto Alegre

2013

AGRADECIMENTOS

Ao Dr Roberto Giugliani e à Dr^a Sandra Leistner-Segal pela oportunidade de realizar este trabalho.

Aos colegas do laboratório de Genética Molecular do SGM/HCPA por toda ajuda e ensinamentos.

À minha família e ao Ricardo por todo apoio e compreensão durante a realização deste trabalho.

RESUMO

A Mucopolissacaridose tipo VI (MPS VI) ou Síndrome de Maroteaux-Lamy, é uma doença lisossômica autossômica recessiva causada pela deficiência da enzima arilsulfatase B (ARSB). O presente estudo analisou as mutações e polimorfismos deste gene em pacientes brasileiros, a fim de caracterizar a frequência das mutações de acordo com a distribuição geográfica. A análise molecular do gene *ARSB* foi realizada em 118 pacientes, inicialmente através de um protocolo de triagem (PCR/RFLP) para detecção das cinco mutações recorrentes no Brasil (p.L72R, p.H178L, p.R315Q, IVS5-1G>C e c.1533del23) e por sequenciamento. Dos 118 pacientes, 66,95% possuem os dois alelos identificados, 11,86% possuem um alelo identificado e 21,19% continuam sem identificação. Entre os pacientes com pelo menos um alelo identificado, 89,25% são homocigotos ou heterocigotos para as cinco mutações comuns. A frequência das cinco mutações comuns por regiões foi: 20,93% no Sudeste, 4,65% no Sul, 43,02% no Nordeste, 0,58% no Norte e 0,58% no Centro-Oeste. Através da análise da distribuição geográfica e as frequências relativas das mutações comuns, foi possível identificar algumas regiões com maior frequência de determinada mutação. A mutação p.L72R foi encontrada com alta frequência na região Sul, ocorrendo em 66,6% dos alelos identificados nesta região. As mutações p.R315Q e c.1533del23 foram encontradas com uma alta frequência na região Sudeste, ocorrendo cada uma delas em 20% dos alelos identificados. Na região Nordeste, as mutações p.H178L e IVS5-1G>C foram encontradas com maior frequência, com 23,86% e 38,63% dos alelos identificados nesta região. Os resultados deste estudo sugerem a necessidade de avaliar a metodologia empregada na análise molecular dos pacientes com MPS VI uma vez que cada região possui um perfil mutacional característico. A detecção através da análise molecular nessas regiões ajudará a estimar a frequência e direcionará o aconselhamento genético para as famílias.

ABSTRACT

The Mucopolysaccharidosis type VI (MPS VI) or Maroteaux-Lamy syndrome, is an autosomal recessive lysosomal disease caused by deficiency of the enzyme arylsulfatase B (ARSB). The present study analyzed the mutations and polymorphisms of this gene in Brazilian patients, in order to characterize the frequency of mutations according to geographical distribution. Molecular analysis of this gene *ARSB* was performed in 118 patients, initially through a screening protocol (PCR / RFLP) for the detection of five recurrent mutations in Brazil (p.L72R, p.H178L, p.R315Q, IVS5-1G>C e c.1533del23) and sequencing. Of the 118 patients, 66.95% have two alleles identified, 11.86% have one allele identified and 21.19% are still unidentified. Among patients with at least one allele identified, 89.25% are homozygous or heterozygous for the five common mutations. The frequency of the five common mutations by region was: 20.93% in the Southeast, 4.65% in the South, 43.02% in the Northeast, 0.58% in the North and 0.58% in the Midwest. Through analysis of the geographical distribution and relative frequencies of the common mutations, it was possible to identify some regions with higher mutation frequency determined. The p.L72R mutation was found with high frequency in the southern region, occurring in 66.6% of the alleles identified in this region. The mutations p.R315Q and c.1533del23 were found with a high frequency in the Southeast, each occurring in 20% of the alleles identified. In the Northeast, the mutations p.H178L and IVS5-1G>C were found most frequently, with 23.86% and 38.63% of the alleles identified in this region. The results of this study suggest the need to evaluate the methodology used in the molecular analysis of patients with MPS VI since each region has a characteristic mutational profile. The detection by molecular analysis in these regions will help to estimate the frequency and direct the genetic counseling for families.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação das Mucopolissacaridoses.....	11
Tabela 2: Polimorfismos descritos no gene <i>ARSB</i>	16
Tabela 3: Mutações recorrentes	20
Tabela 4: Genótipo dos pacientes com as duas mutações identificadas.....	22
Tabela 5: Mutações identificadas	23
Tabela 6: Frequência alélica das mutações comuns.....	25
Tabela 7: Frequência alélica dos polimorfismos identificados	27

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Mecanismo de herança na MPS VI	13
Figura 2: Localização cromossômica e estrutura do gene <i>ARSB</i>	15
Figura 3: Fluxograma para análise molecular	21
Figura 4: Distribuição geográfica dos pacientes com MPS VI no Brasil	24
Figura 5: Localização geográfica das regiões com maior frequência das mutações comuns. 26	
Figura 6: Frequência das mutações identificadas em cada éxon.....	27

LISTA DE ABREVEATURAS

AL: Alagoas

AM: Amazonas

ARSB: *N*-acetilgalactosamina-4-sulfatase ou arilsulfatase B

BA: Bahia

CE: Ceará

CS: Condroitin Sulfato

DL: Doenças Lisossômicas

DS: Dermatan Sulfato

DNA: Ácido desoxirribonucléico

EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético

EIM: Erros Inatos do Metabolismo

ES: Espírito Santo

GAG: Glicosaminoglicanos

GO: Goiás

HGMD: *Human Gene Mutation Database*

HCPA: Hospital de Clínicas de Porto Alegre

HS: Heparan Sulfato

MA: Maranhão

MG: Minas Gerais

MPS: Mucopolissacaridose(s)

MPS VI: Mucopolissacaridose tipo VI

MS: Mato Grosso do Sul

PA: Pará

PB: Paraíba

PCR: Reação em Cadeia da Polimerase

PE: Pernambuco

PI: PiauÍ

PR: Paraná

QS: Queratan Sulfato

RFLP: *Restriction Fragment Length Polimorphism*

RJ: Rio de Janeiro

RN: Rio Grande do Norte

RS: Rio Grande do Sul

SGM: Serviço de Genética Médica

SP: São Paulo

TCH: Transplante de Células Hematopoiéticas

TMO: Transplante de Medula Óssea

TRE: Terapia de Reposição Enzimática

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
1.1 DOENÇAS LISSÔMICAS	10
1.2 MUCOPOLISSACARIDOSES	10
1.2.1 Incidência.....	12
1.3 MUCOPOLISSACARIDOSE TIPO VI.....	12
1.3.1 Manifestações Clínicas	13
1.3.2 Diagnóstico	14
1.3.4 Tratamento.....	14
1.3.5 Aspéctos Genéticos e Moleculares	15
1.3.6 Mutações e Polimorfismos no Gene <i>ARSB</i>	15
2 OBJETIVOS	18
2.1 OBJETIVOS GERAIS	18
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
3. METODOLOGIA.....	19
3.1 AMOSTRAS	19
3.2 COLETA DAS AMOSTRAS E EXTRAÇÃO DE DNA	19
3.3 ANÁLISE DO GENE <i>ARSB</i>	19
4. RESULTADOS	22
5. DISCUSSÃO	28
6. CONCLUSÃO.....	29
7. REFERÊNCIAS	30
8. ANEXO.....	34

1 INTRODUÇÃO

1.1 DOENÇAS LISOSSÔMICAS

As Doenças Lisossômicas (DL) são um grupo dos Erros Inatos do Metabolismo (EIM) causadas pela deficiência na função de uma proteína lisossômica específica, e como consequência, ocorre acúmulo progressivo de um substrato parcialmente degradado dentro dos lisossomos alterando a fisiologia normal das células (Wraith, 2002; Matte, 1998).

Existem mais de 50 DL (Wraith, 2002) que podem ser classificadas em diferentes grupos de acordo com o tipo de substrato acumulado. Os principais grupos de DL são as mucopolissacaridoses, glicoproteinoses e esfingolipidoses (Gieselmann, 1995). Todas as DL são monogênicas autossômicas recessivas, exceto três que possuem herança ligada ao cromossomo X: Mucopolissacaridose tipo II (síndrome de Hunter), doença de Fabry e doença de Danon (Sugie *et al.*, 2003).

1.2 MUCOPOLISSACARIDOSES

As Mucopolissacaridoses (MPS) são um grupo de DL que ocorrem devido à atividade deficiente de uma das 11 enzimas lisossomais responsáveis pela degradação dos glicosaminoglicanos (GAGs).

Os GAGs, anteriormente conhecidos como mucopolissacarídeos, são polímeros longos, não ramificados, formados por unidades alternadas de ácido urônico e hexosamina. Conforme o resíduo de açúcar, o tipo de ligação existente entre eles e o número e localização dos grupos sulfatos, podemos encontrar cinco grupos diferentes: Condroitin Sulfato (CS), Dermatan Sulfato (DS), Heparan Sulfato (HS), Ácido Hialurônico e Queratan Sulfato (QS) (Byers *et al.*, 1998). Estes GAGs podem ter sua degradação interrompida de forma isolada ou combinada, dependendo da enzima deficiente (Neufeld & Muenzer, 2001).

Devido à degradação prejudicada, os GAGs acumulam-se parcialmente degradados no interior das células, e como consequência ocorre disfunção de tecidos e órgãos, resultando em uma manifestação clínica multissistêmica (Neufeld & Muenzer, 2001). Além de serem acumulados no interior das células também são excretados em excesso na urina dos pacientes com MPS (Wraith, 1995).

As MPS são classificadas de acordo com os 11 defeitos enzimáticos, correspondendo a nove fenótipos clínicos: Hurler, Hurler-Scheie, Scheie, Hunter, Sanfilippo, Morquio, Maroteaux-Lamy, Sly e Natowicz (Neufeld & Muenzer, 2001) (Tabela 1).

Essas doenças apresentam curso crônico e progressivo comprometendo principalmente o sistema esquelético e cardiopulmonar, a córnea, a pele, o fígado, baço, o cérebro e as meninges (Schwartz *et al.*, 2001).

Tabela 1: Classificação das Mucopolissacaridoses

MPS	Epônimo	Sigla	Enzima Deficiente	GAGs na urina
I	Hurler, Hurler-Scheie, Scheie	<i>IDUA</i>	α -iduronidase	Dermatan e Heparan Sulfato
II	Hunter	<i>IDS</i>	Iduronato-2-sulfatase	Dermatan e Heparan Sulfato
IIIA	Sanfilippo A	<i>SGSH</i>	Heparan-N-sulfatase	Heparan Sulfato
IIIB	Sanfilippo B	<i>NAGLU</i>	α -N-acetilglicosaminidase	Heparan Sulfato
IIIC	Sanfilippo C	<i>GNAT</i>	AcetilCoA: α -glicosamina acetiltransferase	Heparan Sulfato
IIID	Sanfilippo D	<i>G6S</i>	N-acetilglicosamina-6-sulfatase	Heparan Sulfato
IVA	Morquio A	<i>GALNS</i>	N-acetilgalactosamina-6-sulfatase	Queratan Sulfato
IVB	Morquio B	<i>GLB1</i>	β -galactosidase	Queratan Sulfato
VI	Maroteaux-Lamy	<i>ARSB</i>	N-acetilgalactosamina-4-sulfatase	Dermatan Sulfato
VII	Sly	<i>GUSB</i>	β -glicuronidase	Dermatan e Heparan Sulfato
IX	Natowicz	<i>HYAL1</i>	Hialuronidase	Ácido Hialurônico

(Fonte: Adaptado de Neufeld & Muenzer, 2001)

1.2.1 Incidência

A incidência mundial de todas MPS juntas é aproximadamente de 1:22.000 indivíduos recém-nascidos vivos (Giugliani *et al.*, 2012). No Brasil a incidência das MPS não é completamente conhecida, porém existe no país uma parceria de centros brasileiros que atendem pacientes com MPS chamada Rede MPS Brasil, com o centro coordenador localizado no Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (SGM/HCPA).

De acordo com os registros da Rede MPS Brasil, até dezembro de 2012 foram diagnosticados com algum tipo de MPS 1001 pacientes brasileiros, sendo 195 com MPS I, 300 com MPS II, 137 com MPS III (38 com MPS IIIA, 70 com MPS IIIB, 29 com MPS IIID), 124 com MPS IV (116 com MPS IVA e 8 com MPS IVB), 233 com MPS VI e 12 com MPS VII.

1.3 MUCOPOLISSACARIDOSE TIPO VI

A Mucopolissacaridose tipo VI (MPS VI), também conhecida como Síndrome de Maroteaux-Lamy (OMIM#253200), foi descrita pela primeira vez em 1963 pelos médicos franceses Pierre Maroteaux e Maurice Emile Joseph Lamy (Neufeld & Muenzer, 2001).

É uma doença autossômica recessiva (Figura 1), sendo caracterizada pelo armazenamento intralisossomal e aumento da excreção na urina do GAG DS parcialmente degradado, que ocorre devido à deficiência da enzima *N*-acetilgalactosamina-4-sulfatase ou arilsulfatase B (ARSB), necessária para a degradação de DS (Hopwood *et al.*, 1986; Litjens *et al.*, 1989). Este GAG possui um papel importante na estrutura corporal, especialmente na pele, tendões, vasos sanguíneos, vias aéreas e valvas cardíacas. O DS é acumulado nos tecidos causando alterações progressivas ao longo da vida (Giugliani *et al.*, 2007).

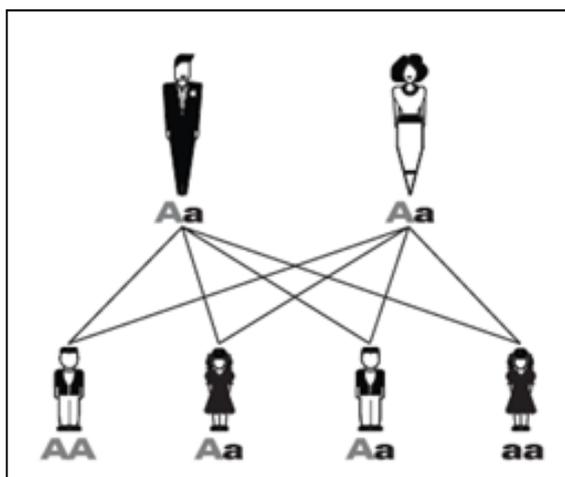


Figura 1: Mecanismo de herança na MPS VI

1.3.1 Manifestações Clínicas

As manifestações clínicas são variáveis, existindo um amplo espectro heterogêneo entre as formas que provavelmente são o resultado do grande número de mutações causadoras da doença (Litjens & Hopwood, 2001).

De acordo com a idade de início dos sintomas, progressão e idade do diagnóstico, três formas clínicas podem ser diferenciadas: grave, caracterizada pelo aparecimento precoce (antes dos dois anos de idade) e rápida progressão da doença, a forma intermediária, com início da doença no final da infância e a forma leve, com início após a segunda década. Tanto formas juvenis como a adulta possuem uma progressão mais lenta do que na forma infantil (Azevedo, 2004; Isbrandt *et al.*, 1994; Villani, 1999).

Apesar do amplo espectro da gravidade clínica associada à doença, as manifestações geralmente incluem baixa estatura, dismorfismo facial progressivo, inteligência normal, opacidade de córnea, otite média recorrente, rinossinusite e pneumonia, doença obstrutiva das vias aéreas, valvulopatia cardíaca, esplenomegalia, hérnia umbilical e inguinal, rigidez e contraturas articulares e anormalidades esqueléticas (<http://www.maroteaux-lamy.com/Portuguese/HCP/Sings.aspx>).

1.3.2 Diagnóstico

O diagnóstico é realizado a partir da suspeita clínica. Se o indivíduo possui aspectos clínicos semelhantes à MPS VI, o médico poderá encaminhá-lo para uma avaliação laboratorial (Giugliani *et al.*, 2010; Wood *et al.*, 2012).

Para o diagnóstico laboratorial, realiza-se inicialmente um teste quantitativo para identificação da concentração dos GAGs na urina, e um teste qualitativo para a identificação dos tipos de GAGs que estão em alta concentração na urina. No caso da MPS VI, o GAG encontrado em alta concentração é o DS. Portanto, se o paciente tiver uma alta concentração de GAG DS, é realizado o ensaio enzimático da ARSB para medir a atividade desta enzima em leucócitos e/ou fibroblastos para o diagnóstico definitivo (Bender, 2011; Azevedo, 2004).

Além disso, deve-se excluir a possibilidade de deficiência múltipla de sulfatases, um diagnóstico diferencial importante. Neste caso, o indivíduo afetado pode ter um quadro clínico semelhante àquele do indivíduos com MPS VI, mas laboratorialmente tem deficiência também de outras sulfatases, como a arilsulfatase A (Azevedo, 2004; Wood *et al.*, 2012). Em suma, para obter o diagnóstico confirmado de MPS VI é necessário a constatação do GAG DS em excesso, redução da atividade da enzima ARSB e ausência da deficiência de outras sulfatases.

Ocorrendo a confirmação, pode-se realizar a análise molecular do gene para identificação das mutações causadoras da doença, porém não é necessária para o diagnóstico. A identificação do genótipo do paciente pode ser útil para prever o fenótipo, sendo possível em alguns casos ser ajudar a tomar decisões terapêuticas, para oferecer o aconselhamento genético para as famílias, para auxiliar no diagnóstico pré-natal e para identificar heterozigotos (Giugliani *et al.*, 2007; Giugliani, 2012; Muenzer, 2011).

1.3.4 Tratamento

A doença não possui cura, porém existem procedimentos que podem minimizar os sintomas e melhorar a qualidade de vida dos pacientes. Os tratamentos específicos disponíveis para a MPS VI incluem a terapia de reposição enzimática (TRE) que consiste em administração intravenosa de galsulfase e o transplante de medula óssea/transplante de células tronco hematopoiéticas (TMO/TCTH) (Wood *et al.*, 2012; Giugliani *et al.*, 2007).

Além dos tratamentos específicos existem medidas de suporte que são realizadas através de uma equipe multidisciplinar como forma melhorar saúde dos pacientes, sendo realizado o aconselhamento nutricional, terapia ocupacional e fisioterapia, e tratamento de complicações dos sintomas (Valayannopoulos *et al.*, 2010).

1.3.5 Aspectos Genéticos e Moleculares

O gene que codifica a enzima ARSB está localizado no braço longo do cromossomo 5 na região 5q13.3 - 5q14.1 (Figura 2) e também se chama arilsulfatase B (*ARSB*) (Litjens *et al.*, 1989; Nyhan & Ozand, 1998). O gene contém 8 éxons (Figura 3), e a enzima resultante é composta de 533 aminoácidos (Peters *et al.*, 1990; Modaresi *et al.*, 1993).

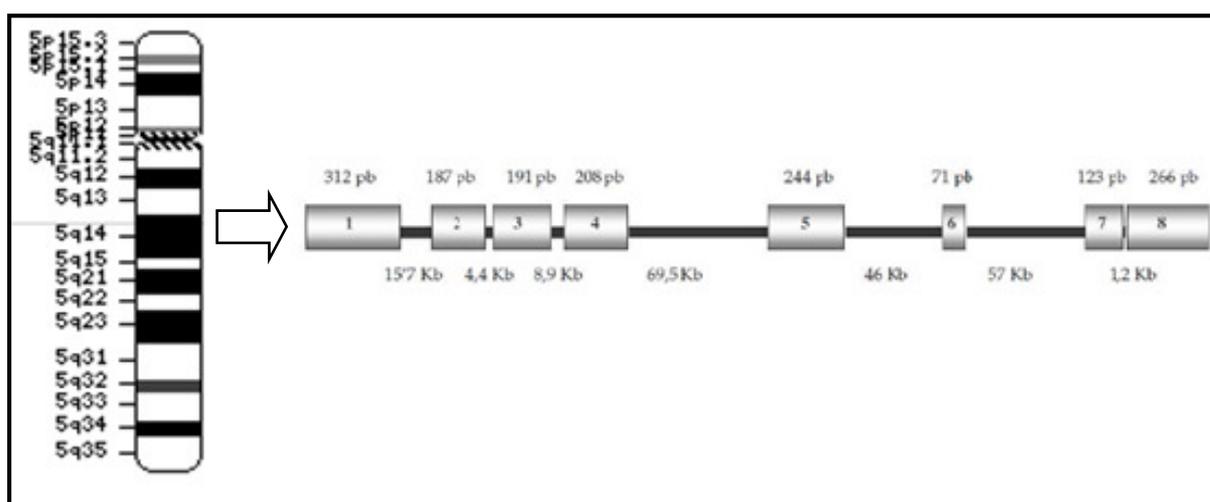


Figura 2: Localização cromossômica e estrutura do gene *ARSB*

(Fonte: adaptado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>; Costa-Motta, 2011)

1.3.6 Mutações e Polimorfismos no Gene *ARSB*

A MPS VI é causada por mutações patogênicas no gene *ARSB* que conduzem à redução ou ausência da atividade da enzima ARSB (Litjens *et al.*, 1989). A partir da caracterização da estrutura do gene inteiro por Modaresi e colaboradores em 1993, tornou-se possível a análise da base molecular da MPS VI, com a identificação dos alelos mutantes (Isbrandt *et al.*, 1994; Jin *et al.*, 1992).

Como a doença possui herança autossômica recessiva, para uma pessoa ser afetada é necessária a presença de mutação nos dois alelos. Se um paciente possui a mesma mutação nos dois alelos ele é homozigoto para a mutação, e se o paciente possui duas mutações diferentes ele é heterozigoto composto. (Valayannopoulos *et al.*, 2010).

A partir da primeira mutação descrita por Wicker *et al.* (1991), uma série de outras mutações tem sido identificadas. Até o momento mais de 150 mutações patogênicas foram descritas neste gene, incluindo: pequenas deleções, grandes deleções, mutações missense, mutações nonsense, mutações em sítio de *splicing*, pequenas inserções e pequena *indel*. Além das mutações, 13 polimorfismos também já foram descritos (Tabela 2) (HGMD, 2013).

Tabela 2: Polimorfismos descritos no gene *ARSB*

Polimorfismos	Alteração no DNA	Região no gene	Referência
L82L	246 G>A	ÉXON I	Karageorgos <i>et al.</i> , 2007
I114I	342 C>T	ÉXON II	Villani <i>et al.</i> , 1999
L124L	370 C>T		Villani <i>et al.</i> , 1999
	691-22 T>C (IVS3-22T>C)	INTRON III	Karageorgos <i>et al.</i> , 2007
G324G	972 A>G	ÉXON V	Villani <i>et al.</i> , 1999
T356T	1068 A>T		Jin <i>et al.</i> , 1991
V358M	1072 G>A		Wicker <i>et al.</i> , 1991
V376M	1126 G>A		Karageorgos <i>et al.</i> , 2007
	1143-27 A>C (IVS5-27A>C)	INTRON V	Karageorgos <i>et al.</i> , 2007
S384N	1151 G>A	ÉXON VI	Voskoboeva <i>et al.</i> , 2000
P397P	1191 A>G		Schuchman <i>et al.</i> , 1990
P454P	1362 G>A	ÉXON VIII	Karageorgos <i>et al.</i> , 2007
Y505Y	1515 C>T		

A frequência alélica das diferentes mutações no gene é muito baixa, estando presente em um ou poucos pacientes, portanto são mutações raras ou privadas, o que demonstra a grande heterogeneidade alélica da MPS VI (Litjens & Hopwood, 2001; Karageorgos *et al.*, 2007). Apesar desta baixa frequência, algumas mutações são frequentes entre os pacientes com MPS VI dependendo da população estudada, como ocorre no Brasil onde a mutação c.1533del23 foi encontrada em 23,1% dos alelos estudados. Esta mutação também ocorre em pacientes de Portugal, no entanto, a frequência é desconhecida (Petry *et al.*, 2003, 2005).

Além da mutação c.1533del23, existem mais quatro mutações que são recorrentes no Brasil: p.L72R, p.R315Q, IVS5-1G>C e p.H178L. Portanto, de acordo com as análises já concluídas das frequências das mutações, foi descrito um protocolo para triagem destas cinco mutações comuns no gene *ARSB* entre os pacientes brasileiros para uma análise inicial dos pacientes com MPS VI (Costa-Motta *et al.*, 2011; Karageorgos *et al.*, 2007; Villani *et al.*, 1999; Petry *et al.*, 2005; Voskoboeva *et al.*, 2000).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Identificar mutações causadoras da MPS VI e polimorfismos intragênicos, através de análise molecular do gene *ARSB*. Com base nos achados moleculares, calcular a frequência de possíveis mutações comuns na MPS VI e caracterizar a distribuição geográfica da MPS VI no Brasil.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Manter e atualizar um banco de material biológico com amostras de pacientes, além de um banco de material biológico para controles; essencial para controle de qualidade e para a realização de pesquisas com MPS;
- 2) Análise molecular dos pacientes com MPS VI da Rede MPS Brasil.

3. METODOLOGIA

3.1 AMOSTRAS

O trabalho foi desenvolvido utilizando amostras de sangue periférico coletadas de pacientes brasileiros não relacionados cadastrados na rede MPS Brasil com diagnóstico bioquímico para MPS VI confirmado. As amostras são provenientes dos estados: Alagoas (AL), Amazonas (AM), Bahia (BA), Ceará (CE), Espírito Santo (ES), Goiás (GO), Maranhão (MA), Minas Gerais (MG), Mato Grosso do Sul (MS), Pará (PA), Paraíba (PB), Pernambuco (PE), Piauí (PI), Paraná (PR), Rio de Janeiro (RJ), Rio Grande do Norte (RN), Rio Grande do Sul (RS) e São Paulo (SP).

Na ocasião da coleta de dados, todos os pacientes concordaram em participar do estudo através do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), assinado pelo participante ou responsável (Anexo I). Até março de 2013, foram cadastrados 118 pacientes brasileiros não relacionados. Para a população controle foram utilizadas amostras do banco de DNA do SGM/HCPA.

3.2 COLETA DAS AMOSTRAS E EXTRAÇÃO DE DNA

As coletas de sangue foram realizadas através de punção intravenosa com agulhas e seringas estéreis e descartáveis. De cada indivíduo foi coletado 5 mL de sangue em tubo estéril com EDTA para posterior extração de DNA. Os tubos foram identificados e enviados para o laboratório, acompanhados de um protocolo clínico e do TCLE. Os tubos são mantidos a 4°C ou congelados até o momento da análise.

A extração de DNA foi realizada conforme técnicas padrões deste procedimento, utilizando proteinase K para eliminação das proteínas celulares e alta concentração de sais para precipitação de DNA (Miller *et al.*, 1988).

3.3 ANÁLISE DO GENE *ARSB*

Os oito éxons que compõem o gene da *ARSB* foram amplificados através da PCR (Reação em Cadeia da Polimerase). As condições de amplificação e as sequências dos

primers para os éxons II, III, IV, V, VI, VIII foram descritos por Petry *et al.* (2005) e os *primers* dos éxons I e VII foram descritos por Isbrandt *et al.* (1994). Os produtos da PCR dos éxons I a VII foram analisados em gel de agarose 1,5% e o éxon VIII em gel de agarose 3% ambos contendo brometo de etídio para confirmação da amplificação.

Para a análise molecular, foi utilizado inicialmente um protocolo para triagem das cinco mutações recorrentes no gene *ARSB* entre os pacientes brasileiros cadastrados na Rede MPS Brasil (Tabela 3). As mutações p.L72R, p.H178L, p.R315Q e IVS5-1G>C são analisadas por RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) seguido de eletroforese em gel de agarose 3%, e a mutação c.1533del23 sendo uma deleção, é analisada diretamente através da eletroforese em gel de agarose do produto da amplificação do éxon.

Tabela 3: Mutações recorrentes

Éxon	Mutação
I	p.L72R
III	p.H178L
V	p.R315Q
VI	IVS5-1G>C
VIII	c.1533del23

Os pacientes que após a triagem permaneceram sem a identificação de um ou ambos os alelos, realizamos a análise de todos os éxons que compõe o gene *ARSB*, através da técnica de sequenciamento direto, a partir dos produtos de PCR purificados utilizando o método de Sanger *et al.* (1977) em sequenciador automatizado *ABI 3500 Genetic Analyzer*, com capilares de 50 cm e polímero POP7 (Applied Biosystems). Os produtos de PCR foram marcados (utilizando 3,2 pmol dos primers referentes a cada éxon, os mesmos utilizados no PCR, e 1µl do reagente *Big Dye Terminator v3.1* (Applied Biosystems) em um volume final de 10 µl.

As reações de marcação foram realizadas em termociclador *Veriti® 96-Well Thermal Cycler* (Applied Biosystems) com uma etapa de desnaturação inicial a 96°C por 1 minuto seguida de 35 ciclos de 96°C por 15 segundos, 50°C por 15 segundos e 60°C por 4 minutos. Após marcadas, as amostras foram purificadas pela precipitação com *BigDye XTerminator Purification Kit* (Applied Biosystems) e eletroinjetadas no sequenciador automático. Os

sequenciamentos foram analisados a fim de detectar e identificar as mutações e polimorfismos do gene *ARSB*. Todas as etapas da análise laboratorial até chegar à identificação das mutações estão ilustradas na Figura 3.

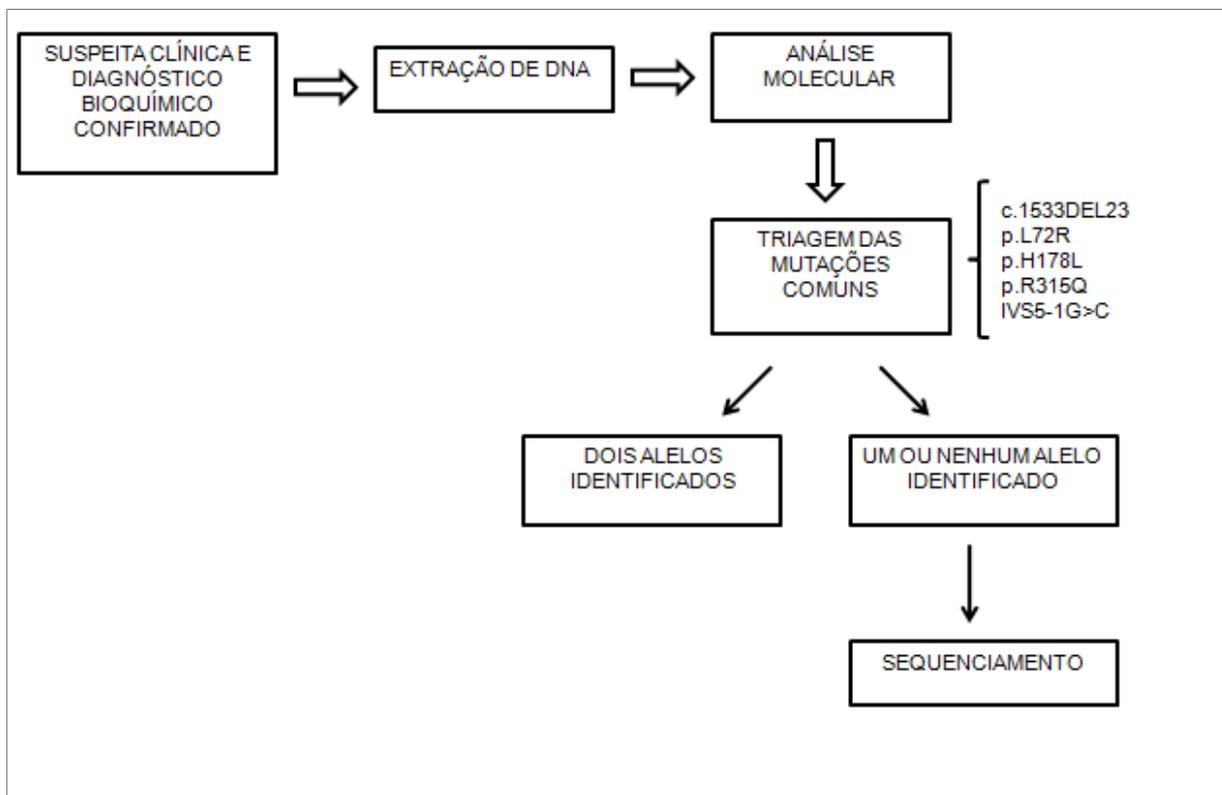


Figura 3: Fluxograma para análise molecular

4. RESULTADOS

Entre os 118 pacientes analisados, 79 (66,95%) tiveram as duas mutações identificadas, 14 (11,86%) tiveram apenas uma mutação identificada e 25 (21,19%) continuam sem identificação. A Tabela 4 apresenta o genótipo dos pacientes com os dois alelos identificados.

Tabela 4: Genótipo dos pacientes com as duas mutações identificadas

Genótipo	Nº de pacientes	Genótipo	Nº de pacientes
IVS5-1G>C/IVS5-1G>C	12	R315Q/D54N	1
H178L/H178L	10	R315Q/IVS5-8T>G	1
L72R/L72R	9	R315Q/IVS5-1G>C	1
1533del23/1533del23	5	R315Q/R160X	1
R315Q/R315Q	4	427delG/427delG	1
IVS5-8T>G/IVS5-8T>G	4	427delG/L72R	1
IVS5-1G>C/427delG	2	427delG/G144R	1
L72R/IVS5-1G>C	2	P93S/IVS5-1G>C	1
L72R/D54N	2	R197X/R197X	1
427delG/IVS5-8T>G	2	D59N/L723	1
R315Q/107-129del	2	108-120del/Q88H	1
IVS5-1G>C/IVS5-8T>G	1	L98Q/L98Q	1
IVS5-1G>C/L72R	1	R160X/R160X	1
H178L/IVS5-1G>C	1	W115X/W115X	1
1533DEL23/R315Q	1	E173K/E173K	1
1533del23/IVS5-1G>C	1	Q104P/W146X	1
1533del23/IVS5-8T>G	1	Y103S/427delG	1
1533del23/L72R	1	1279delA/R315Q	1

No total foram encontradas 23 diferentes mutações, sendo 6 mutações novas e 17 já descritas. Entre os tipos identificados neste estudo, 21,74 % (5/23) são deleções, 17,4% (4/23) são mutações nonsense, 52,17% (12/23) são mutações missense e 8,69% (2/23) são mutações em sítios de *splicing* (Tabela 5).

Tabela 5: Mutações identificadas

Éxon	Mutação	Tipo	Referências
I	c.107-129del23	Deleção	Este estudo
I	c.108-120del	Deleção	(Karageorgos <i>et al.</i> , 2007)
I	p.D54N (c.160G>A)	Missense	(Karageorgos <i>et al.</i> , 2007)
I	p.D59N (c.175G>A)	Missense	(Petry <i>et al.</i> , 2005)
I	p.L98Q (c.293T>A)	Missense	(Karageorgos <i>et al.</i> , 2007)
I	p.L72R (c.215T>G)	Missense	(Petry <i>et al.</i> , 2005)
I	p.Q88H (c.264G>C)	Missense	(Petry <i>et al.</i> , 2005)
I	p.Y86N (c.256T>A)	Missense	Este estudo
I	p.Q104P (c.311A>C)	Missense	Este estudo
I	p.P93S (c.277C>T)	Missense	(Petry <i>et al.</i> , 2005)
I	Y103S (c.308A>C)	Missense	Este estudo
II	c.427delG	Deleção	(Karageorgos <i>et al.</i> , 2007)
II	p.G144R (c.430G>A)	Missense	(Isbrandt <i>et al.</i> , 1994)
II	p.W146X (c.438G>A)	Nonsense	(Voskoboeva <i>et al.</i> , 2000)
II	p.R160X (c.478C>T)	Nonsense	(Voskoboeva <i>et al.</i> , 1994)
II	W115X (c.345C>T)	Nonsense	Este estudo
III	p.H178L (c.533A>T)	Missense	(Karageorgos <i>et al.</i> , 2007)
III	p.E173K (c.517G>A)	Missense	Este estudo
V	p.R315Q (c.944G>A)	Missense	(Villani <i>et al.</i> , 1999)
Intron V	IVS5-1G>C	Sítio de <i>splicing</i>	(Karageorgos <i>et al.</i> , 2007)
Intron V	IVS5-8T>G	Sítio de <i>splicing</i>	(Karageorgos <i>et al.</i> , 2007)
VII	c.1279delA	Deleção	(Petry <i>et al.</i> , 2005)
VIII	c.1533del23	Deleção	(Petry <i>et al.</i> , 2003)

De acordo com a Figura 4, a região brasileira com maior número de pacientes é o Nordeste, correspondendo a 50% dos pacientes, seguida pela região Sudeste com 37,29% pacientes. Entre todos os estados, aquele com o maior número de pacientes é Pernambuco com 16,94%, seguido de São Paulo com 14,4%.

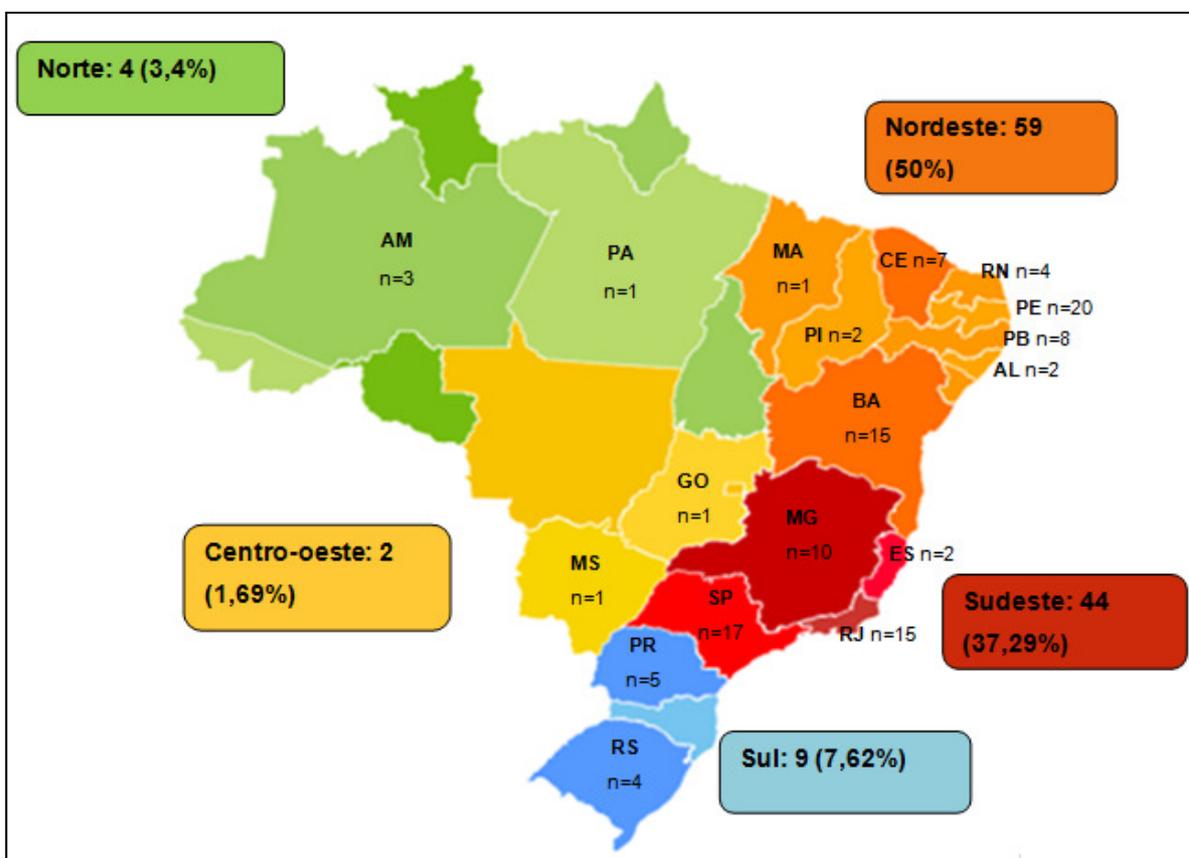


Figura 4: Distribuição geográfica dos pacientes com MPS VI no Brasil

Entre os pacientes com pelo menos um alelo identificado, 89,25% (83/93) são homozigotos ou heterozigotos para as cinco mutações comuns. A frequência alélica das mutações comuns está relatada na Tabela 6, juntas elas representam 71,5% (123/172) dos alelos identificados. A frequência das cinco mutações comuns por regiões foi: 20,93% (36/172) no Sudeste, 4,65% (8/172) no Sul, 43,02% (74/172) no Nordeste, 0,58% (1/172) no Norte e 0,58% (1/172) no Centro-Oeste.

Tabela 6: Frequência alélica das mutações comuns

Mutação	Frequência alélica (%)
p.L72R	15,70
p.H178L	13,95
p.R315Q	8,72
IVS5-1G>C	23,25
c.1533del23	9,88

Através da análise da distribuição geográfica e das frequências relativas das mutações comuns, foi possível relacionar algumas regiões com maior frequência de determinada mutação (Figura 5). A mutação L72R foi encontrada com alta frequência na região Sul, ocorrendo em 66,6% (8/12) dos alelos identificados nesta região.

As mutações R315Q e 1533del23 foram encontradas com uma alta frequência na região Sudeste, ocorrendo cada uma delas em 20% (13/65) dos alelos identificados, juntas corresponderam a 40% dos alelos desta região. Na região Nordeste, as mutações H178L e IVS5-1g>c foram encontradas com maior frequência, com 23,86% (21/88) e 38,63% (34/88) dos alelos identificados respectivamente nesta região, juntas corresponderam a 62,49% dos alelos da região Nordeste (Figura 5).

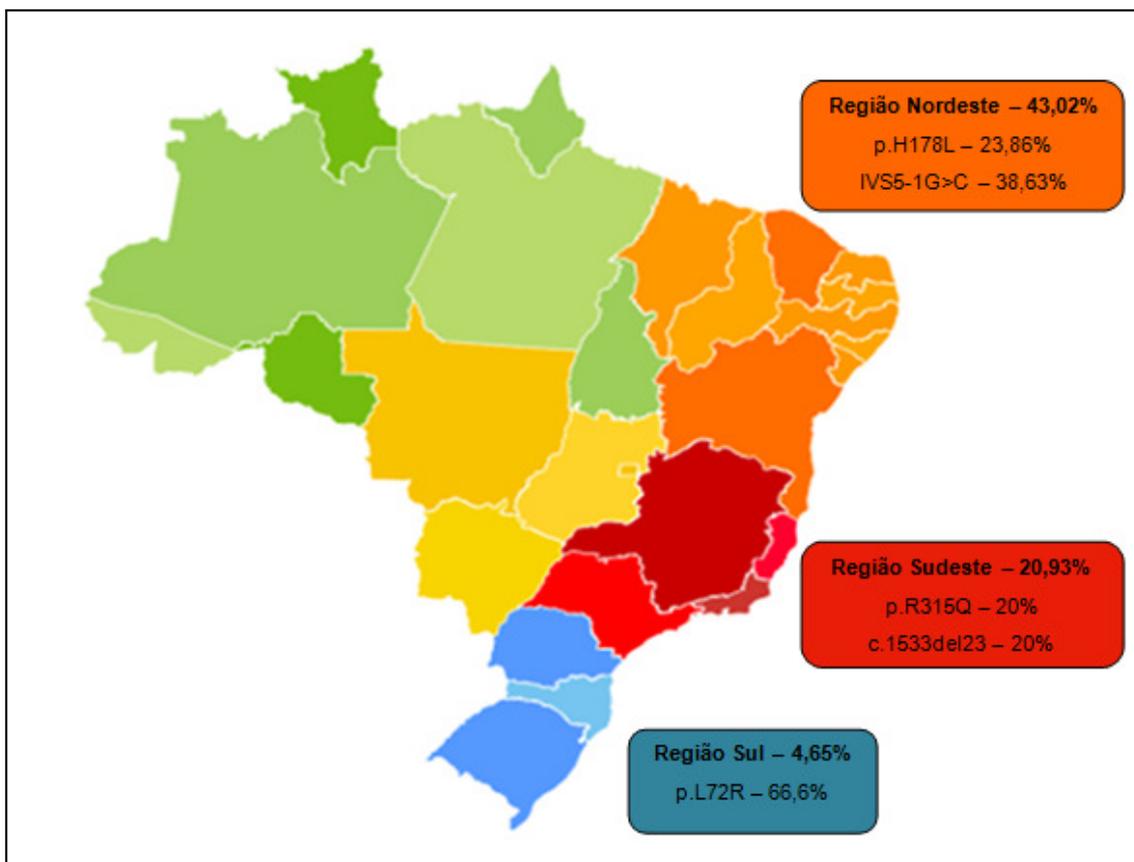


Figura 5: Localização geográfica das regiões com maior frequência das mutações comuns e identificação das regiões com maior frequência de determinadas mutações

O éxon que apresentou maior frequência alélica das mutações, conforme a Figura 6, foi o éxon VI apresentando 32,57% (56/172) dos alelos identificados, seguido pelo éxon I com 23,83% (41/172), éxon 3 com 15,11% (26/172), éxon VIII com 9,88% (17/172), éxon II com 9,3% (16/172), éxon V com 8,72% (15/172), éxon VII com 0,58% (1/172) e no éxon IV nenhuma mutação foi encontrada.

Até o momento, foram identificados 9 polimorfismos dos 13 já descritos no gene *ARSB* (Tabela 7) com um total de 179 alelos polimórficos encontrados até o momento.

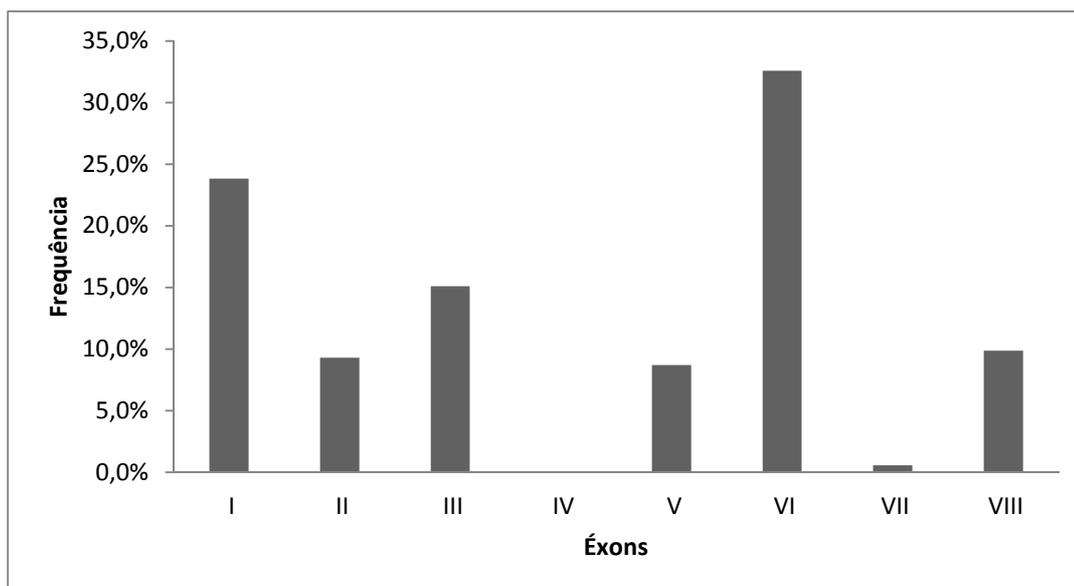


Figura 6: Frequência das mutações identificadas em cada éxon

Tabela 7: Frequência alélica dos polimorfismos identificados

Localização no gene	Polimorfismo	Frequência alélica (%)
Éxon II	L124L	0,56
Intron III	IVS3-22T>C	14,54
	G324G	0,56
Éxon V	T356T	1,12
	V358M	15,08
	V376M	17,32
Intron V	IVS5-27A>C	37,43
Éxon VI	S384N	3,35
	P397P	10,06

5. DISCUSSÃO

Até o momento, foram identificados 72,88% (172/236) alelos mutantes nos pacientes com MPS VI. Dos 118 pacientes, já foram encontrados 79 genótipos diferentes, 23 diferentes mutações e 9 polimorfismos, o que demonstra a ampla heterogeneidade alélica entre os pacientes e o grande número de alelos privados (Petry *et al.*, 2005).

Entre as mutações identificadas, 5 foram deleções, 3 do tipo nonsense, 13 do tipo missense e 2 em sítios de *splicing*. As mutações já identificadas encontram-se ao longo de quase todo o gene, sendo o éxon VI o que apresenta a maior frequência alélica (32,37%). Neste estudo foi possível identificar seis mutações novas (5 missense, 1 nonsense e 1 deleção). Através das análises foi possível identificar que a mutação mais frequente entre os pacientes brasileiros foi a IVS5-1G>C, seguida pela mutação p.L72R, p.H178L, c.1533del23 p.R315Q. Juntas elas representaram 71,5% dos alelos identificados, comprovando a eficácia da utilização da triagem das mutações comuns.

Os pacientes brasileiros com MPS VI estão distribuídos por 18 estados, sendo a grande maioria da região Nordeste com 59 (50%) pacientes, e região Sudeste, com 44 (37,28%), totalizando 103 (87,28%) pacientes. Dos 59 pacientes da região Nordeste, 11 possuem a mutação p.H178L, sendo que estes 11 são do município de Monte Santo, localizado no interior da Bahia, e como já descrito por Costa-Motta e colaboradores (2011), esta região possui pacientes derivados de um efeito fundador. Após a este relato, foi desenvolvido um projeto-piloto para a realização de uma triagem neonatal neste município para detecção de neonatos portadores e afetados por esta mutação, uma vez que todos os pacientes diagnosticados nesta região possuem a mutação p.H178L em homozigose. (Bender, 2011).

Outra mutação identificada com alta frequência na região Nordeste é a IVS5-1G>C, encontrada em 21 pacientes, sendo que destes, 15 são do estado de Pernambuco, onde também é sugerido um efeito fundador nesta região devido ao grande número de pacientes encontrados com a mesma mutação (Costa-Motta, 2011).

6. CONCLUSÃO:

Os resultados obtidos neste trabalho sugerem a necessidade de avaliar a metodologia empregada na análise molecular dos pacientes com MPS VI uma vez que cada região possui um perfil mutacional característico. A utilização da triagem com as cinco mutações mais frequentes, foi capaz de identificar os dois alelos em 48 pacientes e apenas um alelo em 27 pacientes.

O estudo que envolveu o maior número de pacientes com MPS VI para análise molecular foi realizado em 2007, por Karageorgos e colaboradores, totalizando 105 pacientes de diferentes países, representando aproximadamente 10% do número total de pacientes com MPS VI do mundo. Este estudo apresentou a análise de 118 pacientes brasileiros, sendo que número expressivo de pacientes com MPS VI reforça a importância de estudos no Brasil envolvendo esta doença.

Entre as perspectivas futuras, encontram-se a conclusão das análises moleculares através do sequenciamento de todos os éxons, incluindo as regiões intrônicas adjacentes, a realização da análise de haplótipos através da identificação de polimorfismos intragênicos, o que possibilitará a identificação de origens comuns de determinadas mutações em regiões específicas do Brasil, a correlação entre o genótipo e o fenótipo encontrado para tentar definir um prognóstico clínico baseado nestes achados.

Também temos como perspectiva futura definir uma estratégia de detecção de heterozigotos nas regiões aonde existe uma frequência maior de determinada mutação evidenciada por um efeito fundador, importante para o aconselhamento genético das famílias e diagnóstico precoce de gestações em risco para o início do tratamento por TRE.

7. REFERÊNCIAS

AZEVEDO, A.C. **Estudo clínico e bioquímico de 28 pacientes com mucopolissacaridose tipo VI.** Porto Alegre, 2004. Dissertação (mestrado). Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

BENDER, F. **Triagem neonatal para Mucopolissacaridose tipo VI (Síndrome de Maroteaux-Lamy) em uma região com alta incidência da doença.** Porto Alegre, 2011. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

BYERS, S. et al. **Glycosaminoglycan accumulation and excretion in the mucopolysaccharidosis: characterization and basis of a diagnostic test for MPS.** Mol Genet Metab, v. 65, n. 4, p. 282-290, 1998.

COSTA-MOTTA, F.M.M. et al. **Genetic studies in a cluster of Mucopolysaccharidosis type VI patients in Northeast Brazil.** Mol Genet Metab, v. 104, p. 603-607, 2011.

COSTA-MOTTA, F.M.M. **Análise de mutações no gene arilsulfatase B em pacientes com mucopolissacaridose tipo VI no Brasil: Definição de uma possível origem comum em Monte Santo/BA.** Porto Alegre, 2011. Tese (Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

GIESELMANN, V. **Lysosomal storage diseases.** Biochim Biophys Acta, v. 1270, n. 2-3, p. 103-136, 1995.

GIUGLIANI, R.; HARMATZ, P.; WRAITH, J. E. **Management guidelines for mucopolysaccharidosis VI.** Pediatrics, v. 120, n. 2, p. 405-418, 2007.

GIUGLIANI, R. et al. **Mucopolysaccharidosis I, II and VI: Brief review and guidelines for treatment.** Genet Mol Biol, v. 33, n. 4, p. 589-604, 2010.

GIUGLIANI, R. **Newborn screening for lysosomal diseases: current status and potential interface with population medical genetics in Latin America.** J Inherit Metab Dis, v. 35:871-877, 2012.

HGMD – The Human Gene Mutation Database (<http://www.hgmd.org/>)

HOPWOOD, J. J. et al. **Diagnosis of Maroteaux-Lamy syndrome by the use of radiolabelled oligosaccharides as substrates for the determination of arylsulphatase B activity.** Biochem J, v. 234, n. 3, p. 507-514, 1986.

ISBRANDT, D. et al. **Mucopolysaccharidosis VI (Maroteaux-Lamy syndrome): six unique arylsulfatase B gene alleles causing variable disease phenotypes.** Am J Hum Genet, v. 54, n. 3, p. 454-463, 1994.

JIN, W. D.; DESNICK, R. J.; SCHUCHMAN, E. H. **A common polymorphism in the human arylsulfatase B (ARSB) gene at 5q13-q14.** Nucleic Acids Res. v. 19, n. 15, p. 4305, 1991.

JIN, W. D. et al. **Mucopolysaccharidosis type VI: identification of three mutations in the arylsulfatase B gene of patients with the severe and mild phenotypes provides molecular evidence for genetic heterogeneity.** Am J Hum Genet, v. 50, n. 4, p. 795-800, 1992.

KARAGEORGOS, L. et al. **Mutational analysis of 105 mucopolysaccharidosis type VI patients.** Hum Mutat, v. 28, n. 9, p.897-903, 2007.

LITJENS, T. et al. **Chromosomal localization of ARSB, the gene of human n-acetylgalactosamine-4-sulfatase.** Hum Genet, v. 82, n. 1, p. 67-68, 1989.

LITJENS, T.; HOPWOOD, J. J. **Mucopolysaccharidosis type VI: Structural and clinical implications of mutations in N-acetylgalactosamine-4-sulfatase.** Hum Mutat, v. 18, n. 4, p. 282-295, 2001.

MATTE, U. S. **Caracterização molecular de pacientes com Mucopolissacaridose tipo II: um estudo no Brasil.** Dissertação (Mestrado). Porto Alegre, 1998. Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

MODARESSI, S.; RUPP, K.; VON FIGURA, K.; PETERS, C. **Structure of the human arylsulfatase B gene.** Biol Chem Hoppe Seyler, v. 374, n. 5, p.327-335, 1993.

MILLER, S. A.; DYKES, D. D.; POLESKY, H. F. **A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells.** Nucleic Acids Res, v. 16, n. 3, p. 1215, 1988.

MUENZER, J. **Overview of the mucopolysaccharidoses.** *Rheumatology*, v. 50, suppl. 5 p. 4-12, 2011.

NEUFELD, E. F.; MUENZER, J. **The mucopolysaccharidosis.** In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D. (eds.). *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease*, 8th ed. McGraw-Hill, New York, pp. 3421-3452, 2001.

NYHAN, W. L.; OZAND, P. T. **Maroteaux-Lamy disease / Mucopolysaccharidosis VI (MPS VI) / N-Acetylgalactosamine-4-sulfatase deficiency.** In: Nyhan WL, Ozand PT. *Atlas of metabolic diseases.* London: Chapman & Hall. p.477-481, 1998.

PETERS, C. et al. **Phylogenetic conservation of arylsulfatases. cDNA cloning and expression of human arylsulfatase B.** *J Biol Chem*, v. 265, n. 6, p. 3374-81, 1990.

PETRY, M. F. et al. **Identification of a novel mutation in the ARSB gene that is frequent among brazilian MPS VI patients.** *Genet Test*, v. 7, n. 4, p. 347-349, 2003.

PETRY, M. F. et al. **Mucopolysaccharidosis type VI: Identification of novel mutations on the arylsulphatase B gene in South American patients.** *J Inherit Metab Dis*, v. 28, n. 6, p. 1027–1034, 2005.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. **DNA sequencing with chain terminating inhibitors.** *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 74, n. 12, p. 5463-5467, 1977.

SCHUCHMAN, E. H.; JACKSON, C.E.; DESNICK, R. J. **Human arylsulfatase B: MOPAC cloning, nucleotide sequence of a full-length cDNA, and regions of amino acid identity with arylsulfatases A and C.** *Genomics*, v. 6, n. 1, p. 149-158, 1990.

SCHWARTZ, I. et al. **Mucopolissacaridoses.** In: Carakushanski G. *Doenças Genéticas em Pediatria.* 1^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 180-184, 2001.

SUGIE, K. et al. **Characterization of Danon disease in a male patient and his affected mother.** *Neuromuscul Disord*, v. 13, n. 9, p. 708–711, 2003.

VALAYANNOPOULOS, V. et al. **Mucopolysaccharidosis VI.** *Orphanet J of Rare Dis*, 5:5, 2010.

VILLANI, G. R. D. et al. **Maroteaux-Lamy Syndrome: Five novel mutations and their structural localization.** Biochim Biophys Acta, v. 1453, n.2, p. 185-192, 1999.

VOSKOBOEVA, E. et al. **Four novel mutant alleles of the arylsulfatase B gene in two patients with intermediate form of mucopolysaccharidosis VI.** Hum Genet, v. 93, n.3, p. 259-264, 1994.

VOSKOBOEVA, E. et al. **Identification of mutations in the arylsulfatase B gene in Russian mucopolysaccharidosis type VI patients.** Genetika, v. 36, n. 6, p. 837-843, 2000.

WRAITH, J. E. **Lysosomal disorders.** Semin Neonatal, v. 7, n.1, p. 75-83, 2002.

WRAITH, J. E. **The mucopolysaccharidoses: a clinical review and guide to management.** Arch Dis Child, v. 72, n. 3, p. 263-267, 1995.

WICKER, G. et al. **Mucopolysaccharidosis VI (Maroteaux-Lamy syndrome): an intermediate clinical phenotype caused by substitution of valine for glycine at position 137 of arylsulfatase B.** J Biol Chem, v. 266, n.1, p. 21386-21391, 1991.

WOOD, T. et al. **Expert recommendations for the laboratory diagnosis of MPS VI.** Mol Genet Metab, v. 106, n. 1, p. 73–82, 2012.

8. ANEXO



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TÍTULO DO PROJETO: Mucopolissacaridoses no Brasil: um estudo clínico, epidemiológico, genético, bioquímico e genético molecular com impacto no diagnóstico, manejo e prevenção.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Roberto Giugliani, Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rua Ramiro Barcelos 2350, Porto Alegre, RS.

PESQUISADOR ASSOCIADO (informar nome do pesquisador e do centro participante que está avaliando o paciente): _____

Nome do paciente: _____

Endereço: _____

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

Email: _____

Responsável: _____ Idade: _____

RG: _____ Grau de parentesco: _____

Justificativa e objetivos do estudo

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

Procedimentos a que serão submetidos os pacientes

Os pacientes com suspeita de apresentar uma mucopolissacaridose serão submetidos a uma avaliação clínica. Caso a suspeita persista, serão coletadas amostras de urina para análise bioquímica e amostras de sangue para análises bioquímica e/ou molecular. A investigação molecular inclui a análise de DNA para identificação das mutações presentes nas mucopolissacaridoses. Em alguns casos será necessária a repetição dos exames e mesmo a coleta de uma biópsia de pele para o completo esclarecimento do caso. Alguns procedimentos adicionais, como exames de imagens, testes de função pulmonar, testes de mobilidade articular, testes de resistência, estudo do sono, entre outros, poderão ser indicados. Esses exames fazem parte da rotina de atendimento de pacientes com suspeita de mucopolissacaridose. Eventualmente, poderão ser solicitadas amostras de familiares de pacientes para o esclarecimento do caso, identificação de familiares portadores de mutações, aconselhamento genético e diagnóstico pré-natal. Os resultados das análises serão encaminhados ao médico assistente do paciente, ficando sob responsabilidade deste a informação do resultado ao paciente e/ou familiar.

REDA / GPPG
 VER SE APROVADA
 21 / 07 / 09
 N=03066

16 JUL 2009
 03066