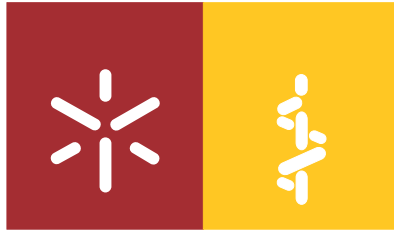


Universidade do Minho
Escola de Ciências da Saúde

Diogo Alexandre do Nascimento Ribeiro

Study of the W402X mutation: frequency of the lysosomal α -L-iduronidase variant in the Portuguese population and function analysis

Estudo da mutação W402X: frequência desta variante da α -L-iduronidase lisossomal na população portuguesa e análise da sua função



Universidade do Minho

Escola de Ciências da Saúde

Diogo Alexandre do Nascimento Ribeiro

Study of the W402X mutation: frequency of the lysosomal α -L-iduronidase variant in the Portuguese population and function analysis

Estudo da mutação W402X: frequência desta variante da α -L-iduronidase lisossomal na população portuguesa e análise da sua função

Dissertação de Mestrado
Mestrado em Ciências da Saúde

Trabalho realizado sob a orientação da
Doutora Olga A. M. Oliveira Amaral
e co-orientação da
Professora Doutora Patrícia Espinheira de Sá Maciel

Janeiro de 2012

DECLARAÇÃO

Nome: Diogo Alexandre do Nascimento Ribeiro

Endereço electrónico: diogo.ribeiro24@gmail.com

Número do Bilhete de Identidade: 12559341

Título da dissertação:

Study of the W402X mutation: frequency of the lysosomal α -L-iduronidase variant in the Portuguese population and function analysis

Estudo da mutação W402X: frequência desta variante da α -L-iduronidase lisossomal na população portuguesa e análise da sua função

Orientadora:

Doutora Olga A. M. Oliveira Amaral

Co-orientadora:

Professora Doutora Patrícia Espinheira de Sá Maciel

Ano de conclusão: 2012

Designação do Mestrado:

Mestrado em Ciências da Saúde

DE ACORDO COM A LEGISLAÇÃO EM VIGOR, NÃO É PERMITIDA A REPRODUÇÃO DE QUALQUER PARTE DESTA TESE/TRABALHO

Universidade do Minho, ____/____/____

Assinatura: _____

O trabalho presente nesta tese foi realizado no Centro de Genética Médica Doutor Jacinto Magalhães (CGMJM), Unidade de Investigação e Desenvolvimento – Porto (UID-P) do Departamento de Genética do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (INSA, IP.), Porto, Portugal. O apoio financeiro foi fornecido pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia (PIC/IC/82822/2007).

À minha família e à Cátia...

Agradecimentos

Ao terminar mais uma etapa deste caminho que é a vida, gostaria de expressar o meu profundo agradecimento a todos os que de uma forma ou de outra contribuíram para a realização desta dissertação de mestrado. MUITO OBRIGADO A TODOS!

À Doutora Olga por me ter dado a oportunidade de integrar a sua equipa do projecto de investigação, pela entusiasmante orientação deste trabalho, pela confiança que depositou nas minhas capacidades e por me ter incentivado a concorrer a um programa de mestrado. Agradeço ainda todos os conhecimentos transmitidos e todo o rigor científico e sugestões que ajudaram a melhorar a redacção desta tese. Obrigado por toda a disponibilidade e amizade, pois mais que chefe e orientadora foi uma professora e uma grande amiga, cheia de boa disposição, alegria e divertida...

À Professora Doutora Patrícia Maciel pela disponibilidade e atenção sempre prestadas e pela supervisão deste trabalho.

À minha colega e amiga Joana por toda a disponibilidade e amizade, pois mais que uma colega de secretária e de bancada, foste uma grande amiga cheia de alegria, boa disposição e muito divertida... Obrigado pelas correcções e sugestões na redacção desta dissertação. Obrigado pelas visitas quando eu estava na sala das culturas!

À Lurdes e à Natália, pela disponibilidade, ajuda e instrução nas culturas celulares no início da execução deste trabalho.

À Eugénia, colega do projecto de investigação, pela forma simpática como sempre se disponibilizou para ajudar-me durante a execução deste trabalho.

Ao Doutor João Lavinha, responsável pela Unidade de Investigação do Departamento de Genética por ter-me dado a possibilidade de efectuar este trabalho nesta unidade.

Ao Doutor Luís Vieira por ter-me recebido na Unidade de Tecnologia e Inovação (UTI) com toda a disponibilidade e simpatia, pela grande ajuda no desenvolvimento do método de dHPLC e por todo o interesse que demonstrou pelo meu trabalho. Agradeço ainda aos elementos do seu grupo, em especial à Ana Cardoso, pela simpatia com que receberam-me e por todos os conhecimentos transmitidos relativamente à técnica de dHPLC.

Ao Pedro Oliveira, pela simpatia e pela grande ajuda no tratamento estatístico dos dados resultantes deste trabalho.

À Unidade de Rastreio Neonatal (URN), pela gentileza na cedência do material anónimo excedentário do Programa Nacional de Rastreio Neonatal (INSA – Centro de Genética Médica Dr. Jacinto Magalhães) que foi utilizado neste trabalho.

À Comissão Directiva do programa de Mestrado em Ciências da Saúde por autorizar que a realização do trabalho desta dissertação de mestrado tivesse lugar no Centro de Genética Médica Dr. Jacinto Magalhães – INSA, IP., Porto.

Às Professoras Joana Palha e Paula Ludovico. Obrigado pelo óptimo programa de mestrado que construíram, mas principalmente obrigado por estarem sempre disponíveis para ouvirem a opinião dos alunos.

A todo o pessoal do Mestrado e do Doutoramento. Sofia, Bárbara, Cristina, Patrícia, Diana, Bruno, Pedro, Ricardo, Marta, Ana Rita, António, Ana, Ashley, Andreia, Miguel, Sara, Vítor, Magda, João. Obrigado por todos os momentos que partilhamos durante o primeiro ano de mestrado.

Às minhas colegas da Unidade de Investigação, Mariana, Liliana Matos, Liliana Santos, Francisca e Natália, agradeço todos os momentos de boa disposição.

Aos meus pais, a quem devo tudo o que sou... pelo apoio e carinho incondicionais, por estarem sempre comigo, pela confiança que sempre depositaram em mim e no meu trabalho, o meu mais sincero obrigado...

Por fim, à Cátia por todo o amor e pela compreensão, apoio, carinho e paciência que tens sempre demonstrado ao longo destes anos... Por me ajudares a construir a pessoa que sou hoje e por insistires que eu ia conseguir... E por mais tudo aquilo que aqui não pode ser escrito, esta tese também é tua!

“Estudo da mutação W402X: frequência desta variante da α -L-iduronidase lisossomal na população portuguesa e análise da sua função”

As Doenças Lisossomais de Sobrecarga (DLSs) são um grupo de doenças metabólicas hereditárias raras. Na população portuguesa, as DLSs têm uma prevalência de aproximadamente 1/4000 nados vivos. A Mucopolissacaridose tipo I (MPS I) é uma doença autossómica recessiva, que resulta da actividade deficiente da enzima lisossomal α -L-iduronidase (IDUA), e está presente na população portuguesa com uma prevalência de 1.33/100000 nados vivos. Apesar da existência de mais de 100 mutações causais, a mutação W402X é a causa genética mais frequente; a homozigotia para a mutação W402X está associada ao fenótipo clínico mais grave (síndrome de Hurler, MPS IH). Assim, a relevância do estudo desta mutação é evidenciada pelo facto de se tratar de uma mutação pan-europeia relacionada com um fenótipo grave. Tem, inclusivamente, sido sugerido que esta mutação pode ser uma chave essencial para a compreensão da patofisiologia da MPS IH.

Surgiram três questões principais que justificaram uma investigação mais aprofundada: qual seria a frequência da mutação W402X na população portuguesa? Existiria um haplótipo comum nos alelos mutados detectados? Seria possível melhorar o fenótipo e, talvez, recuperar parcialmente a função deste mutante, utilizando mecanismos de supressão *nonsense*?

Neste trabalho determinou-se que a frequência alélica da mutação W402X na população portuguesa em geral é de 0,20% (IC: 0,08-0,39), utilizando duas técnicas de genotipagem distintas, PCR-RFLP e PCR-dHPLC. Em termos de haplótipos foi encontrada variabilidade nos alelos mutados detectados, o que parece indicar uma grande divergência entre os alelos W402X. Aparentemente o SNP mais frequentemente associado à mutação W402X em portugueses e brasileiros é o Q33H, seria interessante saber se na população irlandesa esta associação também se verifica.

Adicionalmente, ao caracterizar funcionalmente a mutação W402X do gene *IDUA*, comprovou-se que, não só, esta mutação resulta em *nonsense mediated decay*, mas também que é susceptível a mecanismos de supressão de *nonsense* com dois compostos distintos, a gentamicina e a cicloheximida (CHX). Face aos resultados obtidos com os diferentes tratamentos, o efeito de supressão da CHX na mutação *nonsense* W402X do gene *IDUA* provou ser o mais eficaz. Verificou-se que o aumento de expressão do gene *IDUA* na linha celular de um doente MPS IH homozigótico para a mutação W402X permitiu atingir níveis semelhantes aos da linha celular controlo não sujeita a tratamento.

“Study of the W402X mutation: frequency of the lysosomal α -L-iduronidase variant in the Portuguese population and function analysis”

Lysosomal storage diseases (LSDs) are a group of rare inherited metabolic disorders. In the Portuguese population, LSDs have a prevalence of $\approx 1/4000$ live births. Mucopolysaccharidosis type I (MPS I) is an autosomal recessive disorder, which results from the defective activity of the lysosomal α -L-iduronidase (IDUA), and is present in the Portuguese population at 1.33/100000 live births. Despite the existence of over 100 causal mutations, W402X is the most frequent genetic cause; homozygosity for W402X is associated to the most severe clinical phenotype (Hurler syndrome; MPS IH). Thus, the relevance of studying this mutation is evidenced by the fact that it is pan-european and related to a severe phenotype. It has, inclusively, been suggested that this mutation may hold an essential role for the comprehension of the MPS IH pathophysiology.

Three major questions arose and were worth further investigation: what was the frequency of mutation W402X in the Portuguese population? Was there a common haplotype in the mutated alleles? Was it possible to ameliorate the phenotype and, perhaps, partially recover this mutant's function using nonsense suppression mechanisms?

In this work it was determined that the allelic frequency of mutation W402X in the Portuguese population in general is 0.20% (IC: 0.08-0.39) using two different techniques of genotyping, PCR-RFLP and PCR-dHPLC. In terms of haplotype, variability was found among the mutated alleles, which seems to indicate a wide divergence between alleles W402X. Apparently the SNP most frequently associated with mutation W402X in the Portuguese and Brazilian is the Q33H, it would be interesting to know if this association is also observed in the Irish population.

In addition, by functionally characterizing mutation W402X of the *IDUA* gene, it turns out that not only does this mutation result in nonsense mediated decay, but it is also susceptible to suppression of nonsense with two different compounds, gentamicin and cycloheximide (CHX). Given the results obtained with different treatments, the effect of CHX on suppression of the nonsense mutation W402X of the *IDUA* gene proved to be the most efficient. It was found that the increase of the *IDUA* gene expression in a W402X homozygous cell line attained levels similar to those of the control cell line without treatment.

Agradecimentos	vii
Resumo	ix
Abstract	x
Abreviaturas	xv
1. Introdução	1
1.1. Conceitos gerais sobre Doenças Lisossomais de Sobrecarga (DLSs)	1
1.2. Mucopolissacaridoses (MPSs)	3
1.2.1. Mucopolissacaridose tipo I	5
1.2.1.1. MPS IH (síndrome de Hurler)	6
1.3. Diagnóstico Bioquímico e Molecular das MPSs	7
1.4. Bioquímica e Genética Molecular da MPS I	8
1.5. dHPLC como abordagem para o despiste de mutações frequentes	9
1.6. Modelos Animais	10
1.7. Desenvolvimento de Terapias para as MPSs	11
1.7.1. Terapia de substituição enzimática	12
1.7.2. Terapia de transplante de medula óssea	13
1.7.3. Terapia Génica	14
1.8. <i>Nonsense mediated mRNA decay</i> e mutações <i>nonsense</i>	14
2. Objectivos	18
3. Material e Métodos	19
3.1. Amostras biológicas	19
3.2. Extracção de DNA	19
3.3. PCR-RFLP	19
3.4. PCR-dHPLC	20
3.4.1. Amplificação por PCR	20
3.4.2. Condições de dHPLC	21
3.5. Preparação dos produtos de PCR para posterior sequenciação	22
3.5.1. Amplificação das regiões codificantes do gene <i>IDUA</i>	22
3.5.2. Purificação dos produtos de PCR por método enzimático	22
3.5.3. Reacção de sequenciação	22
3.5.4. Purificação dos produtos de sequenciação	23
3.5.5. Sequenciação dos fragmentos	23
3.6. Pesquisa de SNPs nos casos portadores identificados	23
3.7. Análise do efeito de supressão da mutação <i>nonsense</i> W402X	25

3.7.1. Cultura de Células.....	25
3.7.2. Crioconservação das linhas celulares de fibroblastos	25
3.7.3. Reposição em cultura das linhas celulares de fibroblastos crioconservadas	26
3.7.4. Experiências de supressão da mutação <i>nonsense</i> W402X.....	26
3.7.5. Obtenção de <i>pellet</i> celular de fibroblastos.....	27
3.7.6. Extração de RNA e síntese de cDNA.....	27
3.7.7. Análise do mRNA por PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR).....	28
4. Resultados.....	30
4.1. Extração de DNA.....	30
4.2. PCR-RFLP	30
4.3. PCR-dHPLC	31
4.4. Determinação da frequência da mutação W402X	34
4.5. Pesquisa de SNPs nos casos de portadores identificados	35
4.6. Análise do efeito de supressão da mutação <i>nonsense</i> W402X	36
5. Discussão	39
6. Conclusão e Perspectivas Futuras	46
7. Bibliografia	48

Índice de Figuras

Figura 1 – Vias do catabolismo do sulfato de dermatano (A) e do sulfato de heparano (B); no passo 2 de cada uma das vias actua a enzima lisossomal α -L-iduronidase (Adaptado de (9))	5
Figura 2 – Esquema representativo dos 14 fragmentos amplificados para sequenciar as regiões codificantes do gene <i>IDUA</i> (Adaptado de (54))	22
Figura 3 – Resultado da amplificação do exão 9 do gene <i>IDUA</i> de diferentes amostras; 1-13 – amostras de DNA; M – marcador de peso molecular 100 pb (HyperLadder™ IV, Bioline)	30
Figura 4 – Resultado da digestão com Bfal do exão 9 do gene <i>IDUA</i> de diferentes amostras; 1- controlo homozigótico; 2- controlo heterozigótico; 3 ao 7 - amostras de DNA (6 – amostra de portador); M – marcador de peso molecular 100 pb (HyperLadder™ IV, Bioline)	31
Figura 5 – Resultado da amplificação do exão 9 do gene <i>IDUA</i> de diferentes amostras para depois ser analisado por dHPLC; 1-13 – amostras de DNA; M – marcador de peso molecular 100 pb (HyperLadder™ IV, Bioline)	31
Figura 6 – Diferentes perfis de dHPLC do exão 9 do gene <i>IDUA</i> ; A – SNP T410T (Hetero); B – SNP T410T (Homo); D – SNP G409R (Homo); F – SNP G409R (Hetero); H – W402X (Hetero); C, E e G – amostras normais	33
Figura 7 – Gráfico com as percentagens obtidas dos diferentes SNPs encontrados na análise por dHPLC	34
Figura 8 – Sequenciação do exão 9 do gene <i>IDUA</i> de um dos portadores da mutação W402X (TR(G>A)G)	35
Figura 9 – Gráfico com as percentagens obtidas dos diferentes haplótipos encontrados nos portadores da mutação W402X	36
Figura 10 – Curvas de amplificação do cDNA das diluições sucessivas (A= 1:1; B= 1:2; C=1:10; D= 1:20; E= 1:100) da pool de amostras controlo não submetidas a tratamento (Equação da recta padrão: $y = -4,371940 \log x + 40,035328$; $R^2 = 0,99$)	37
Figura 11 – Gráfico com as diferenças no nível de expressão do gene <i>IDUA</i> obtido nas linhas celulares utilizadas e submetidas a duas concentrações diferentes de cicloheximida ou gentamicina	38

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Principais Doenças Lisossomais de Sobrecarga.....	3
Tabela 2 – Classificação das Mucopolissacaridoses.....	4
Tabela 3 – Características dos SNPs que normalmente encontram-se associados a mutação W402X	24
Tabela 4 – Primers utilizados na amplificação dos exões 1, 3 e 7 do gene IDUA.....	24
Tabela 5 – Condições de PCR utilizadas na amplificação dos exões 1, 3 e 7 do gene IDUA.....	24
Tabela 6 – Diferentes concentrações e tempos de incubação dos antibióticos utilizados	27
Tabela 7 – Quantidades dos diferentes componentes do <i>Mix</i> para a reacção de qRT-PCR	29
Tabela 8 – Despiste da mutação mais frequente no gene <i>IDUA</i> na população portuguesa em geral: W402X	34
Tabela 9 – Os diferentes haplótipos encontrados nos alelos mutados	35
Tabela 10 – Quantificação relativa (ng/μl) dos vários cDNAs sintetizados por qRT-PCR no aparelho ABI PRISM 7000 (Applied Biosystems)	37

Abreviaturas

- DNA** – DNA complementar ao mRNA
- CG** – Complexo de Golgi
- CHX** – Cicloheximida
- CTPs** – Codões de terminação prematura
- ddNTPs** – Di-desoxirribonucleótidos trifosfato
- dHPLC** – Cromatografia Líquida de Alta Performance Desnaturante
- DLSs** – Doenças Lisossomais de Sobrecarga
- DNA** – Ácido desoxirribonucleico
- dNTPs** – Desoxirribonucleótidos trifosfato
- GAGs** – Glicosaminoglicanos
- IDUA** – α -L-iduronidase
- M6P** – Manose-6-fosfato
- MPS** – Mucopolissacaridose
- MPSs** – Mucopolissacaridoses
- MPS I** – Mucopolissacaridose tipo I
- MPS IH** – Síndrome de Hurler
- MPS IH/S** – Síndrome de Hurler/Scheie
- MPS IS** – Síndrome de Scheie
- mRNA** – RNA mensageiro
- NMD** – *Nonsense mediated mRNA decay*
- pb** – Pares de bases
- PCR** – *Polymerase Chain Reaction*
- qRT-PCR** – *quantitative Real Time - Polymerase Chain Reaction*
- RER** – Reticulo endoplasmático rugoso

RFLP – *Restriction fragment length polymorphism*

RNA – Ácido ribonucleico

rpm – Rotações por minuto

SD – Sulfato de dermatano

SH – Sulfato de heparano

SNC – Sistema nervoso central

SNPs – Polimorfismos de um único nucleotídeo

SSCP – *Single strand conformation polymorphism*

SVF – Soro vitelo fetal

TEAA – Acetato de trietilamónio

UV – Ultravioleta

UV-Vis – Ultravioleta – Visível

1. Introdução

1.1. Conceitos gerais sobre Doenças Lisossomais de Sobrecarga (DLSs)

As Doenças Lisossomais de Sobrecarga (DLSs) são um grupo de aproximadamente 50 doenças metabólicas hereditárias raras originadas por defeitos na função lisossomal, isto é, resultam da deficiência num organelo das células do nosso organismo, o lisossoma (1, 2).

As DLSs são causadas por uma disfunção lisossomal, geralmente como consequência da deficiência numa única enzima necessária para o metabolismo de lípidos, glicoproteínas ou mucopolissacarídeos. Individualmente as DLSs têm uma incidência inferior a 1:100.000, mas como grupo a incidência é de cerca de 1:5000 – 1:10.000 (1, 3). A maioria das DLSs são doenças hereditárias autossómicas recessivas, porém algumas DLSs, como a doença de Fabry e o síndrome de Hunter (MPS II), são doenças de transmissão ligada ao cromossoma X (4, 5).

Os lisossomas, que estão presentes em todas as células nucleadas, são organelos intracelulares usualmente referidos como centros de reciclagem das células, pois é nestes organelos que se realizam os processos de transformação de materiais indesejados em substâncias que as células podem utilizar. Os lisossomas degradam estes materiais indesejados utilizando enzimas lisossomais especializadas, activas a pH ácido e necessárias para a sobrevivência celular. As DLSs aparecem quando uma determinada enzima lisossomal está presente num nível residual muito baixo ou está completamente ausente (6). No entanto, ao longo dos anos foi provado que algumas DLSs também envolvem alterações em proteínas integrais de membrana, proteínas de transporte e proteínas activadoras. Seja qual for a origem da disfunção, os produtos que estavam destinados a serem degradados e reciclados vão sendo armazenados nas células. Apesar de cada uma das DLSs resultar de mutações genéticas diferentes, que se traduzem numa deficiência enzimática específica, todas partilham uma característica bioquímica comum – a acumulação anormal de substâncias no lisossoma.

As DLSs manifestam-se frequentemente na infância, resultando em baixa qualidade de vida e elevada taxa de mortalidade. O período de sobrevida pode ter uma duração variável, sendo por vezes acompanhado de uma deterioração lenta com implicações graves para os doentes e respectivas famílias.

O quadro clínico das DLSs varia podendo apresentar uma forma contínua entre um fenótipo ligeiro ou grave, dependendo da doença em particular e de inúmeras variáveis, nomeadamente da idade em que surgem os primeiros sintomas e da progressão da doença. Os

sintomas podem incluir atraso no desenvolvimento, distúrbios de comportamento, convulsões, demência, surdez e/ou cegueira. Alguns doentes apresentam hepatomegalia e esplenomegalia, neurodegeneração, problemas pulmonares, oculares ou cardíacos, e desenvolvimento ósseo anormal.

A maioria dos doentes é inicialmente diagnosticada através de um teste enzimático, que é o método mais eficiente para se chegar a um diagnóstico definitivo. Além disso, depois de ser realizado o diagnóstico por meios bioquímicos, a análise mutacional deve ser realizada de forma a identificar as mutações causais e permitir o aconselhamento genético dos familiares de modo direccionado. Quando a mutação ou mutações causadoras da doença são conhecidas, a análise mutacional pode ser oferecida às famílias.

A primeira DLS a ser descrita foi a doença de Tay-Sachs, em 1881, seguindo-se a doença de Gaucher em 1882. No final dos anos 50 e no início dos anos 60, de Duve e seus colaboradores, usando técnicas de fraccionamento celular, estudos citológicos e análises bioquímicas, identificaram e caracterizaram os lisossomas como sendo os organelos celulares responsáveis pela digestão intracelular e reciclagem de macromoléculas. Este foi o avanço científico que levaria à compreensão da base fisiológica das DLSs, sendo então a doença de Pompe, em 1963, também identificada como uma DLS tendo como causa uma deficiência na enzima α -glicosidase (revisto em (7)).

Os lisossomas são compostos, na sua maioria, por proteínas lisossomais solúveis ou transmembranares, biossintetizadas nos ribossomas associados ao retículo endoplasmático rugoso (RER), com subsequente translocação dos polipéptidos para o lúmen do RER onde são N-glicosilados em resíduos específicos de asparagina no contexto Asn-X-Ser/Thr (onde X é qualquer aminoácido). Estas glicoproteínas são transportadas para a face *cis* do complexo de Golgi (CG) onde, no caso das glicoproteínas lisossomais solúveis, a adição do grupo fosfato a resíduos específicos de manose do N-oligossacárido origina a formação do marcador de endereçamento lisossomal manose-6-fosfato (M6P). Na rede *trans* do CG, as glicoproteínas ligam-se a receptores específicos membranares (receptores M6P). Os referidos receptores são responsáveis pelo transporte vesicular das glicoproteínas lisossomais até ao sistema endosomal/lisossomal. Outras enzimas solúveis e proteínas não enzimáticas são transportadas para os lisossomas por vias de transporte lisossomais independentes dos marcadores M6P, através de receptores alternativos, como a proteína lisossomal integral da membrana LIMP-2 ou a sortilina (8).

Na Tabela 1 são apresentadas as principais DLSs de acordo com a proteína afectada e as principais substâncias armazenadas.

Tabela 1 – Principais Doenças Lisossomais de Sobrecarga.

Doença	Proteína deficiente	Principais materiais armazenados
Fabry	α -Galactosidase A	Globotriaosilceramida
Lipogranulomatose de Farber	Ceramidase ácida	Ceramida
Gaucher	β - Glucocerebrosidase ácida; activador Saposina-C	Glicosilceramida
Niemann-Pick A e B	Esfingomielinase ácida	Esfingomielina
Gangliosidose GM1	β -Galactosidase	Gangliosídeo GM1
Gangliosidose GM2 (Tay-Sachs)	β -Hexosaminidase A	Gangliosídeo GM2 e glicolipidos relacionados
Gangliosidose GM2 (Sandhoff)	β -Hexosaminidase A e B	Gangliosídeo GM2 e glicolipidos relacionados
MPS I (Hurler, Scheie, Hurler/Scheie)	α -L-Iduronidase	Sulfato de dermatano Sulfato de heparano
MPS II (Hunter)	Iduronato 2-sulfatase	Sulfato de dermatano Sulfato de heparano
Pompe	α -Glucosidase	Glicogénio
Cistinose	Cistinosina	Cistina
Danon	LAMP-2	Glicogénio
Mucopolidose IV	Mucolipina-1	Lípidos e mucopolissacarídeos ácidos
Niemann-Pick C	NPC1 e NPC2	Colesterol e esfingolipidos
Galactosialidose	Catepsina A	Sialo-oligossacarídeos
Mucopolidose II	N-acetilglucosaminil 1-fosfotransferase	Oligossacarídeos, mucopolissacarídeos e lipidos

Adaptado de (7).

1.2. Mucopolissacaridoses (MPSs)

As mucopolissacaridoses (MPSs) são um grupo de doenças lisossomais de sobrecarga causadas pela deficiência de enzimas lisossomais necessárias para catalisar a degradação dos glicosaminoglicanos (GAGs) ou mucopolissacarídeos. Os GAGs não degradados ou parcialmente degradados ficam armazenados nos lisossomas e são excretados na urina. Assim sendo, esta acumulação de GAGs nos lisossomas vai resultar numa disfunção das células, dos tecidos e dos órgãos. São conhecidas 11 enzimas disfuncionais que dão origem a 7 MPSs distintas (MPS I até MPS IX). Dependendo da enzima que está disfuncional, o catabolismo do sulfato de dermatano

(Figura 1A), do sulfato de heparano (Figura 1B), do sulfato de queratano, do sulfato de condroitina, ou do hialurano pode ser bloqueado de forma isolada ou em conjunto. Estas doenças são crónicas e progressivas, e geralmente apresentam um vasto espectro de severidade clínica, mesmo com a deficiência de apenas uma enzima (9).

A classificação (síndromes e subtipos) e as principais características (enzimas afectadas e GAGs afectados) das diferentes MPSs estão sumarizadas na Tabela 2.

Tabela 2 – Classificação das Mucopolissacaridoses.

Tipo (síndrome)	OMIM	Locus Cromossómico	Enzima deficiente	Glicosaminoglicano afectado
MPS IH (Hurler)	252800	4p16.3	α -L-Iduronidase	Sulfato de dermatano, sulfato de heparano
MPS IS (Scheie)	252800	4p16.3	α -L-Iduronidase	Sulfato de dermatano, sulfato de heparano
MPS IH/S (Hurler-Scheie)	252800	4p16.3	α -L-Iduronidase	Sulfato de dermatano, sulfato de heparano
MPS II (Hunter)	309900	Xq28	Iduronato sulfatase	Sulfato de dermatano, sulfato de heparano
MPS IIIA (Sanfilippo A)	252900	17q25.3	Heparano N-sulfarase (sulfamidase)	Sulfato de heparano
MPS IIIB (Sanfilippo B)	252920	17q21.3	α -N-acetil-glucosaminidase	Sulfato de heparano
MPS IIIC (Sanfilippo C)	252930	8p11.1	Acetil-CoA: α -glucosamida-N-acetiltransferase	Sulfato de heparano
MPS IIID (Sanfilippo D)	252940	12q14	N-acetilglucosamina-6-sulfatase	Sulfato de heparano
MPS IVA (Morquio A)	253000	16q24.3	Galactose 6-sulfatase	Sulfato de queratano, 6-sulfato de condroitina
MPS IVB (Morquio B)	250310	3q21.33	β -Galactosidase	Sulfato de queratano
MPS VI (Maroteaux-Lamy)	253200	5q13-q14	Arilsulfatase B	Sulfato de dermatano
MPS VII (Sly)	253220	7q21.11	β -Glucuronidase	Sulfato de dermatano, sulfato de heparano; 4, 6-sulfato de condroitina
MPS IX	601492	3p21.2-p21.3	Hialuronidase	Hialurano

Adaptado de (9).

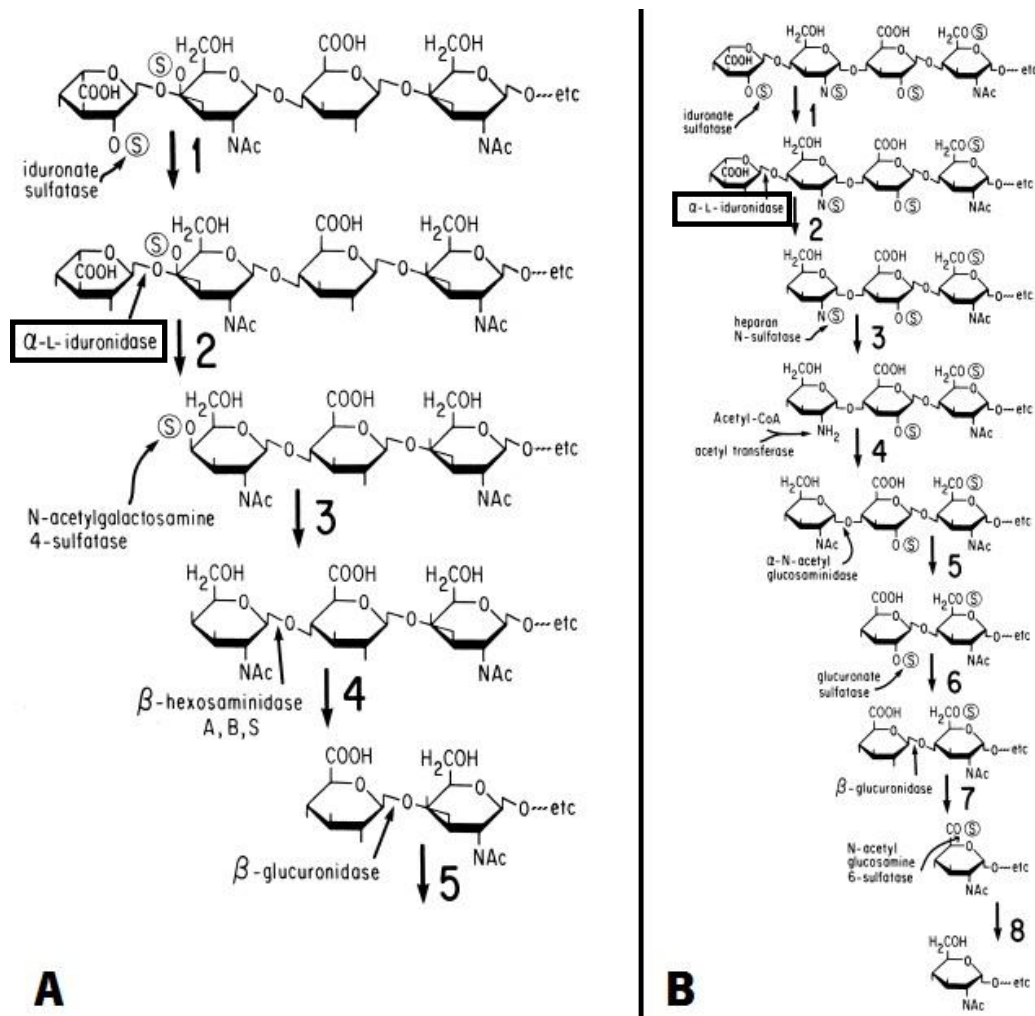


Figura 1 – Vias do catabolismo do sulfato de dermatano (**A**) e do sulfato de heparano (**B**); no passo **2** de cada uma das vias actua a enzima lisossomal α-L-iduronidase (Adaptado de (9)).

1.2.1. Mucopolissacaridose tipo I

A mucopolissacaridose tipo I (MPS I; OMIM# 252800) é uma doença autossómica recessiva rara que resulta de uma deficiência na enzima lisossomal α-L-iduronidase (IDUA; EC 3.2.1.76) que está envolvida na degradação catabólica de GAGs, mais especificamente do sulfato de heparano (SH) e sulfato de dermatano (SD). O facto de nesta doença haver uma deficiência na α-L-iduronidase vai levar à acumulação intra-lisossomal de SH e SD não degradados ou parcialmente degradados, o que coincide com o início da patologia (9). Embora o fenótipo clínico da MPS I apresente um espectro contínuo de uma forma grave para uma forma atenuada, tradicionalmente a MPS I é subdividida em três fenótipos clínicos distintos: o síndrome de Hurler (MPS IH; OMIM# 607014), a forma mais severa; o síndrome de Hurler/Scheie (MPS IH/S; OMIM# 607015), a forma intermédia; e por fim, o síndrome de Scheie (MPS IS; OMIM# 607016), a forma atenuada (9). Estes três fenótipos clínicos representam formas alélicas da

mesma patologia e não podem ser distinguidos bioquimicamente por procedimentos de rotina de diagnóstico, porque todos apresentam as seguintes características: excreção urinária excessiva de SH e SD; ausência de actividade da enzima α -L-iduronidase; e acumulação de GAGs em fibroblastos cultivados, que é corrigível pela absorção de α -L-iduronidase. Actualmente, a análise mutacional permite a classificação de alguns doentes mas, na maior parte dos casos, a atribuição do subtipo de MPS I só pode ser realizada com base em critérios clínicos, incluindo a taxa de progressão dos sintomas e o grau de envolvimento neurológico (9).

1.2.1.1. MPS IH (síndrome de Hurler)

O síndrome de Hurler é uma doença progressiva que envolve múltiplos órgãos e tecidos, e que leva a morte na infância. À nascença uma criança com síndrome de Hurler pode apresentar apenas hérnias inguinais e umbilicais. O diagnóstico do síndrome de Hurler é normalmente feito entre os 4 e os 18 meses; a combinação de deformidades esqueléticas, infecções recorrentes do nariz e ouvidos, hérnias inguinais e umbilicais, características faciais grosseiras, hepatoesplenomegalia, e língua de tamanho anormal são um conjunto de características que exigem atenção médica (10). Cardiomiopatia fatal com fibroelastose cardíaca confirmada por autópsia também tem sido uma característica presente em algumas crianças com MPS I com menos de 1 ano (11, 12). O facto de existir uma insuficiência cardíaca pode preceder o reconhecimento de uma doença de sobrecarga, pois as primeiras manifestações de MPS IH podem ser subtis e inespecíficas. Doentes com o síndrome de Hurler podem ter uma estatura normal na infância, mas é comum haver uma desaceleração de crescimento entre os 6 e os 18 meses. O atraso no desenvolvimento é geralmente evidente entre os 12 e os 24 meses, atingindo um máximo funcional até cerca dos 2 a 4 anos, seguidos de uma deterioração progressiva. A maioria das crianças com o síndrome de Hurler desenvolvem apenas competências linguísticas limitadas devido ao atraso no desenvolvimento, à perda crónica de audição e ao tamanho anormal da língua. Algum grau de perda de audição é provavelmente universal, normalmente devido a uma combinação de problemas neurosensoriais com problemas condutivos. A maioria das crianças com o síndrome de Hurler tem infecções respiratórias recorrentes do tracto superior e dos ouvidos, apresentam uma respiração ruidosa e uma congestão nasal persistente. Durante o primeiro ano de vida aparece normalmente uma turvação progressiva da córnea podendo, em alguns casos, ocorrer o aparecimento de glaucoma (13). As causas de morte mais comuns destes doentes são: doença obstrutiva das vias

respiratórias, infecção respiratória e complicações cardíacas. A doença arterial coronária difusa grave pode aparecer no decorrer do síndrome de Hurler, contudo a angiografia coronária selectiva subestima a extensão da doença (14, 15). Alterações radiológicas podem ser detectadas no síndrome de Hurler, em consequência de um grupo amplo de anomalias esqueléticas presente na MPS e conhecido como displasia esquelética progressiva ou disostose múltipla (16).

1.3. Diagnóstico Bioquímico e Molecular das MPSs

A análise dos GAGs urinários foi o primeiro método disponível para diagnóstico das MPSs e ainda é muito útil como teste preliminar de diagnóstico. Numerosos testes foram desenvolvidos, desde testes com sangue seco semiquantitativos a determinações precisas qualitativamente e quantitativamente (revistos em (17-20)). A identificação dos GAGs urinários pode ajudar a discriminar uma determinada MPS entre todas as classes de MPSs, mas não permite discriminar entre subgrupos. Os testes utilizando sangue seco são rápidos, baratos e úteis para uma avaliação preliminar (21-23). Um método rápido semiquantitativo baseia-se na metacromasia de uma solução de complexos corantes de GAGs (24, 25). Tem sido sugerido que ao fazerem-se apenas medições quantitativas pode-se obter falsos negativos, pois embora apresentem um nível normal de GAGs, têm uma distribuição anormal dos mesmos (20).

Após ter efectuado um diagnostico diferencial através da análise dos GAGs urinários, o diagnóstico definitivo de uma MPS é estabelecido por um ensaio enzimático, específico e preciso ((26, 27); e revisto em (28)). Como as enzimas lisossomais estão presentes em todas as células, excepto nos eritrócitos, a deficiência de uma enzima lisossomal pode ser determinada em fibroblastos em cultura, leucócitos ou no soro, sendo que a escolha depende da própria enzima, da sua estabilidade e das condições de colheita, bem como da preferência do laboratório que vai realizar o teste. As glicosidases podem ser facilmente analisadas com um substrato cromogénico (p-nitrofenil) ou um substrato fluorogénico (4-metilumbeliferil).

O diagnóstico pré-natal é feito por rotina em vários laboratórios utilizando como material biológico células em cultura, provenientes do fluido amniótico ou de biopsias de vilosidades coriônicas, e utilizando o mesmo tipo de ensaios enzimáticos usados em fibroblastos cultivados.

Os testes de portador são frequentemente requisitados pelas famílias de doentes com MPS, uma vez que a análise do DNA pode determinar, de forma definitiva, o estado de portador desta doença. Como grande parte dos doentes são heterozigóticos compostos, os alelos causais

do probando devem ser conhecidos antes de se despistar o estatuto de portador de uma MPS num indivíduo em risco. Algumas mutações são tão frequentes (por exemplo, Q70X, W402X e P533R no gene *IDUA*) que o seu despiste em indivíduos de risco torna desnecessária a caracterização total do gene. Assim, o diagnóstico molecular pode ser efectuado testando mutações específicas, tornando a identificação de mutações mais fácil, económica e rápida, o que é particularmente importante para o diagnóstico pré-natal.

1.4. Bioquímica e Genética Molecular da MPS I

A α -L-iduronidase, a enzima glicosidase que está deficiente na MPS I, hidrolisa os resíduos terminais de ácido α -L-idurónico do sulfato de dermatano e do sulfato de heparano. Originalmente estudada como “factor correctivo de Hurler” (29), a enzima foi purificada e caracterizada de tecido humano (30-33) e animais (34, 35). As sequências proteicas, que foram deduzidas através da sequência do cDNA que codifica a α -L-iduronidase humana (36), canina (35) e de ratinho (37), têm um alto grau de homologia, e o tamanho das proteínas determinadas tem 653, 655 e 634 aminoácidos, respectivamente. Experiências de biossíntese em fibroblastos em cultura estabeleceram que a enzima é sintetizada numa forma precursora (74 kDa), que é processada intracelularmente para uma forma mais pequena (69 kDa) com a perda de cerca de 100 aminoácidos na zona N-terminal, e possuindo a marcação de manose-6-fosfato para se dirigir aos lisossomas (35, 36, 38, 39). A forma activa da enzima existe na forma monomérica. A análise dos resíduos de carboidratos da α -L-iduronidase humana recombinante secretada por células CHO em sobreexpressão, mostrou que embora todos os 6 locais de glicosilação sejam utilizados, os resíduos de manose-6-fosfato apenas são colocados nos locais 3 e 6 (40-42). A enzima recombinante é endocitada eficientemente pelos receptores da manose-6-fosfato presentes nos lisossomas (40). Embora, ainda não tenha sido determinada por cristalização a estrutura da α -L-iduronidase, a estrutura tridimensional do seu local activo já foi determinada (43). Utilizando a estrutura tridimensional, determinada por cristalografia, da proteína homóloga β -D-xilosidase foi criado um modelo homólogo parcial (44).

O gene que codifica a α -L-iduronidase (*IDUA*) tem um tamanho de 19 kb e inclui 14 exões (45). Está localizado no cromossoma 4p16.3, na vizinhança do gene da doença de Huntington (46, 47). Até agora, mais de 100 mutações diferentes do gene *IDUA* têm sido descritas como causadoras da doença (*Human Gene Mutation Database*, <http://www.hgmd.org>). Baseado no desequilíbrio de associação entre os haplótipos do gene *IDUA* e as mutações da

MPS I, Scott *et al.* postulou a existência de alguns alelos comuns (48, 49). De facto dois alelos principais, W402X e Q70X, e um alelo menor, P533R, são responsáveis por mais de metade dos alelos de MPS I da população de origem europeia. Nenhum destes alelos produz enzimas funcionais e, isoladamente ou em combinação, podem dar origem à forma mais severa da deficiência da enzima IDUA, ou MPS IH. A frequência relativa das variantes alélicas W402X e Q70X varia em diferentes partes da Europa (50-52), sendo que o alelo P533R é mais frequente em Itália (53, 54) e áreas mediterrânicas (55). Estes alelos europeus não foram encontrados nos doentes de MPS IH da Arábia Saudita (56) nem nos doentes de MPS IH japoneses (57), uma vez que estes dois grupos de doentes apresentam mutações causais únicas.

A mutação mais comum do gene *IDUA* que tem sido identificada em pacientes com MPS I é a W402X representando aproximadamente 50% dos alelos causais da doença no Norte da Europa, Reino Unido, América do Norte (58-60) e Espanha (51), enquanto que na Rússia, Itália e Brasil a sua frequência foi estimada em 4% (52), 11% (53, 54) e 20% (61), respectivamente. Este trabalho centrou-se na mutação W402X da MPS I, não apenas porque esta é uma das MPSs mais significativas na população portuguesa (1.33/100000 nados vivos), mas também porque W402X é a mutação mais comum em pacientes com MPS I e aparece em aproximadamente 60% dos alelos em pacientes portugueses não relacionados (62, 63).

1.5. dHPLC como abordagem para o despiste de mutações frequentes

Actualmente o despiste em larga escala de mutações é feito utilizando métodos convencionais como a amplificação por PCR seguida de SSCP (*single strand conformation polymorphism*) ou RFLP (*restriction fragment length polymorphism*), com a posterior análise da sequência do DNA, ou fazendo a sequenciação completa do gene.

A Cromatografia Líquida de Alta Performance Desnaturante (*Denaturing high performance liquid chromatography*, dHPLC) é uma técnica semi-automática para despiste de alterações no DNA, que foi desenvolvida na década de 90 (64-67) e tem sido cada vez mais usada para testar a presença de mutações causadoras de doenças (68). A detecção de mutações genéticas e polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs) baseia-se na formação de heteroduplexos e na posterior separação de espécies moleculares de heteroduplexos e homoduplexos, sob condições parciais de desnaturação, por meio de pares de iões do suporte da cromatografia de fase reversa. Uma única substituição de uma base, pequenas inserções ou deleções podem ser distinguidas pelos seus perfis de desnaturação, em comparação com o

perfil do homoduplexo normal correspondente. Após a identificação exacta da mutação, os fragmentos com perfis anormais de dHPLC podem ser posteriormente sequenciados. A sensibilidade desta técnica é determinada pela temperatura, e a temperatura ideal pode ser prevista utilizando um programa de computador específico. As substituições de um único nucleotídeo, as deleções e as inserções podem ser detectados por fluorescência UV dentro de 2-3 minutos em fragmentos não purificados com um tamanho de 1,5 kb. A sensibilidade e a especificidade da dHPLC excedem os 96%. Estas características, aliadas a um baixo custo, fazem com que a dHPLC seja uma das ferramentas mais poderosas para fazer a resequenciação de genomas. Além da sua aplicação ao nível da análise mutacional de genes candidatos, a dHPLC provou ser um importante instrumento na elucidação da evolução humana e no mapeamento genómico. Empregando condições de desnaturação completa, a utilização da dHPLC foi estendida para a genotipagem de polimorfismos conhecidos, utilizando a capacidade do poli(estireno-divinilbenzeno) para resolver moléculas de DNA de cadeia simples de tamanho idêntico, que diferem apenas numa única base. A dHPLC tem sido utilizada com sucesso para realizar o rastreio de doenças lisossomais como Gaucher, Niemann-Pick C e a doença de Fabry (68-71). Recentemente, um novo método de análise por dHPLC foi desenvolvido para a detecção de 12 mutações (incluindo a mutação W402X) e algumas variantes da sequência no gene *IDUA* (72).

1.6. Modelos Animais

Existem modelos animais para a maior parte das MPSs. A maioria surgiu espontaneamente em colónias de animais existentes, tendo já sido previamente caracterizados dois modelos animais naturais de MPS IH. O primeiro modelo animal identificado foi um modelo felino, que possuía uma deleção de três nucleotídeos no gene *IDUA* que resulta na perda de um aspartato altamente conservado entre várias espécies na proteína α -L-iduronidase (73, 74). Mais tarde, foi identificado um modelo canino, que possuía uma mutação de *splicing* que causa a retenção do intrão 1 e leva à terminação prematura da síntese proteica da α -L-iduronidase (75-77). Para além destes modelos animais naturais, dois modelos murinos de MPS IH foram gerados usando estratégias de *knock-out* que interrompem o gene *IDUA*, utilizando para tal uma cassete de inserção (78, 79). Os modelos animais MPS IH têm fenótipos que são geralmente consistentes com as principais manifestações clínicas em pacientes com MPS IH, incluindo a actividade deficiente da α -L-iduronidase (79, 80), a acumulação de GAGs na maioria dos tecidos

(74, 78, 79, 81, 82), a excreção aumentada de GAGs na urina (79, 83), a acumulação de GM2 e GM3 gangliosídeos no cérebro (84, 85), a aparência facial anormal (84, 86), as alterações esqueléticas (79, 87), a neuropatologia (88, 89) e as demais manifestações cardíacas (90, 91).

Estes modelos animais provaram ser ferramentas valiosas para investigar a patogénese da MPS IH e avaliar as diversas estratégias terapêuticas, como o transplante de células estaminais (80), a terapia de substituição enzimática (92) e a terapia genética (83, 87). No entanto, estes modelos animais não eram muito úteis na avaliação da eficácia de outras abordagens terapêuticas. Em particular, na aplicação de terapias que têm como alvo uma mutação específica ou um tipo de mutação. Com o objectivo de obter um modelo animal MPS IH que pudesse ser utilizado para investigar uma ampla gama de abordagens terapêuticas, foi gerado por Wang e seus colaboradores um modelo de ratinho *knock-in* *Idua*-W392X que possui uma mutação nonsense correspondente à mutação *IDUA*-W402X, a mutação mais comum encontrada em pacientes com MPS IH. O fenótipo dos ratinhos *Idua*-W392X foi avaliado em três idades diferentes e descobriram que os ratinhos mutantes desenvolveram a doença de forma progressiva e quantificável. Encontraram-se alterações bioquímicas, metabólicas e morfológicas evidentes, que estão intimamente relacionadas com o fenótipo descrito para outros modelos animais MPS IH (78, 79, 82), bem como com o fenótipo de doentes de MPS IH (9). Assim, este ratinho *Idua*-W392X pode permitir avaliar a eficácia de algumas abordagens terapêuticas, que anteriormente foram limitadas pela indisponibilidade de um modelo animal MPS IH adequado (93).

1.7. Desenvolvimento de Terapias para as MPSs

A descoberta das DLSs por Baudhuin e seus colaboradores foi acompanhada pela previsão optimista de que estas doenças deveriam ser tratadas por enzimas exógenas, que chegariam aos lisossomas através do processo de endocitose (94). Esta hipótese foi apoiada pela verificação de que a suplementação enzimática resultava muito bem em culturas celulares. O catabolismo dos GAGs nos fibroblastos derivados de doentes MPS pode ser restaurado a níveis normais pela adição de “factores correctivos” ao meio de cultura (95). Este “factores correctivos” foram posteriormente identificados como as enzimas lisossomais exógenas que tinham o marcador de reconhecimento da manose-6-fosfato que permitia uma eficiente endocitose mediada por receptor nos fibroblastos (96, 97).

Estas observações fundamentaram o desenvolvimento das terapias para as MPSs. A enzima relevante pode ser administrada directamente (terapia de substituição enzimática), ou pode ser administrada indirectamente por transplante de tecidos de um dador (terapia de transplantação de medula óssea) ou por células autólogas geneticamente modificadas para expressarem a enzima (terapia genética) com o objectivo de eliminar a acumulação lisossomal nos pacientes.

1.7.1. Terapia de substituição enzimática

A correcção do catabolismo deficiente dos GAGs, em células em cultura, através de substituição enzimática, foi efectuado há três décadas (41), mas a compreensão de todo o processo só foi atingida há pouco tempo. Testar este procedimento em modelos animais apresentou-se problemático, pois a enzima purificada a partir de tecidos não apresenta o sinal de ligação manose-6-fosfato. Esta dificuldade apenas foi ultrapassada após clonagem dos cDNAs e produção de enzimas recombinantes. As células animais em culturas estáveis, que foram transfectadas para sobreexpressarem enzimas lisossomais, secretam quantidades substanciais destas enzimas com o marcador da manose-6-fosfato intacto, o que facilita a purificação de enzimas funcionais do meio de cultura (40, 41).

Os modelos animais provaram ser muito úteis para testar a terapia de substituição enzimática. Muitos testes foram conduzidos com a α -L-iduronidase recombinante em cães com MPS I, tendo-se verificado uma diminuição da progressão da doença e, embora tenham-se desenvolvido anticorpos contra a enzima recombinante, a reacção anafilática aguda foi prevenida através de uma pré-medicação de anti-histamínicos e de uma infusão lenta da enzima. Nestes diversos testes verificou-se uma eliminação rápida da enzima recombinante em circulação (92, 98).

A experiência obtida com a substituição enzimática em cães MPS I permitiu iniciar testes clínicos em humanos com a α -L-iduronidase recombinante em pacientes com MPS I, onde os primeiros resultados revelaram uma redução da hepatoesplenomegalia, uma diminuição dos GAGs excretados na urina, e mudanças clínicas como uma melhor amplitude do movimento articular, diminuição da dor, e actividade e resistência melhoradas (99). Estes resultados preliminares muito promissores mantiveram-se durante um longo período de tempo, e a substituição enzimática com α -L-iduronidase humana recombinante tornou-se um tratamento farmacológico para a MPS I. Actualmente o tratamento com a Laronidase® (Aldurazyme®) está

licenciado nos EUA, Europa e Canadá no tratamento das manifestações não-SNC (Sistema Nervoso Central) de MPS I.

1.7.2. Terapia de transplante de medula óssea

Os primeiros testes clínicos com administração de plasma, leucócitos, fibroblastos, ou membrana amniótica falharam na melhoria dos aspectos clínicos da doença, provavelmente porque estes procedimentos apenas forneciam uma quantidade insuficiente de enzima (28). Em 1981, Hobbs e os seus colaboradores demonstraram que, o transplante de medula óssea alogénica numa criança de 9 anos de idade com o síndrome de Hurler, podia melhorar drasticamente as características somáticas da doença (100).

O transplante de medula óssea bem sucedido e estável em doentes MPS IH tem resultado numa melhoria significativa dos aspectos somáticos da doença e num aumento do tempo de sobrevivência dos doentes (101-106). A completa resolução ou melhoria foi notada para a hepatoesplenomegalia, a rigidez articular, apneia obstrutiva do sono, doença cardíaca, hidrocefalia comunicante, e perda de audição. Ao contrário da melhoria verificada na maioria dos tecidos somáticos após o transplante de medula óssea, as anomalias esqueléticas (107-109) e oculares (110) foram apenas parcialmente corrigidas. Em relação às anomalias esqueléticas, embora se tenham tornado menos severas, a maioria dos doentes MPS IH transplantados acabaram por desenvolver na mesma a disostose múltipla.

Os resultados clínicos que advêm do transplante de medula óssea nos doentes MPS variam consideravelmente. Os factores que afectam o resultado do transplante de medula óssea incluem o tipo de MPS, o genótipo do dador, o grau de envolvimento clínico e a idade do doente quando é efectuado o transplante (111-113).

Embora o transplante de medula óssea tenha modificado significativamente a história natural da doença e tenha melhorado a sobrevivência de alguns doentes MPS, este procedimento não é curativo. A doença somática é geralmente melhorada, excepto ao nível esquelético e ocular, enquanto que a nível neurológico os resultados variam muito. O transplante de medula óssea é um procedimento que acarreta um alto risco de morbilidade e mortalidade, nomeadamente pelo insucesso na obtenção de um enxerto estável e devido à reacção enxerto versus hospedeiro. Esta terapia deve ser utilizada, de forma ponderada, em casos devidamente seleccionados que tenham tido um aconselhamento e acompanhamento pré-transplante extensivo, e com uma monitorização sistemática dos resultados a longo prazo.

1.7.3. Terapia Génica

O primeiro nível de desenvolvimento da terapia génica foi a construção de vectores virais que possuíssem o cDNA do gene que codifica a enzima, tendo sido demonstrado que células transfectadas com estes vectores conseguem expressar altos níveis de enzima e tornam-se dadoras da enzima correcta *in vitro*. O nível seguinte de desenvolvimento da terapia génica foi realizado através da utilização de células transfectadas *in vivo* em modelos animais de MPS I para se determinar a habilidade destas células no fornecimento de enzima às células do hospedeiro. O terceiro nível consiste na realização de testes clínicos em doentes com MPS I.

A expressão da enzima em fibroblastos deficientes e em células progenitoras da medula óssea (CD34+) de doentes do síndrome de Hurler, que foram transfectadas com um vector retroviral que possui o cDNA correspondente, foi demonstrada para MPS I. Os fibroblastos transfectados conseguem secretar α -L-iduronidase para absorção das células neuronais e da glia, e as células CD34+ transfectadas conseguem secretar α -L-iduronidase para ser absorvida por fibroblastos MPS I e macrófagos (114-116).

Os “novos-órgãos” representam uma nova abordagem para assegurar a sobrevivência a longo prazo das células secretoras de enzima terapêutica modificadas geneticamente. As células são embebidas em retículos de colagénio, que são cirurgicamente implantados na cavidade peritoneal, onde elas são vascularizadas para formarem os “novos-órgãos”. Esta nova abordagem foi utilizada para fornecer α -L-iduronidase humana de “novos-órgãos” ao fígado e ao baço de ratinhos, mas o efeito terapêutico não pode ser devidamente aferido porque os ratinhos utilizados não eram deficientes em α -L-iduronidase (117).

Os testes clínicos estão a ser realizados com muita precaução e sem expectativas de que estes possam fornecer uma terapia efectiva a curto prazo. A terapia génica para a MPS I sofre dos mesmos problemas da terapia génica em geral: o fornecimento ineficaz e a expressão transitória do gene em questão (118). Mas podemos esperar que, conforme melhores vectores forem desenvolvidos, eles serão depois aplicados à MPS I. A terapia génica para a MPS I pode ser considerada promissora, mas ainda está no início do seu desenvolvimento.

1.8. *Nonsense mediated mRNA decay* e mutações *nonsense*

Mutações *nonsense* e *frameshift* geram codões de terminação prematura (CTPs), que podem causar a degradação do mRNA através de um mecanismo pós-transcricional chamado *nonsense mediated mRNA decay* (NMD).

O NMD é considerado um mecanismo de controlo de qualidade, que encontra-se em todas as células eucarióticas, baseado na prevenção da expansão de polipeptídeos truncados (119), ou seja, elimina activamente as moléculas de mRNA que contêm uma mutação stop prematura (120). Pensa-se que, o NMD evolui no sentido de prevenir a expressão potencialmente prejudicial destes polipeptídeos truncados, que podem ser provenientes de genes normais que sofreram erros na transcrição ou no *splicing* do RNA, ou a partir de genes mutantes que contêm mutações *nonsense* ou *frameshift*. Um estudo recente sugere que o NMD regula diferentes processos de transcrição e não apenas os CTPs (121). Um inibidor da tradução, a cicloheximida (CHX), é conhecida por suprimir o NMD (122) e, portanto, é usada para comprovar o envolvimento da via NMD e poderia ser usada para suprimir mutações *nonsense* como a W402X do gene *IDUA*.

O processo NMD pode ser relevante em termos da apresentação fenotípica de doenças humanas causadas por mutações *nonsense*. Em alguns casos, a falta de uma proteína mutante devido ao NMD poderia resultar num fenótipo mais suave, pois o efeito da deleção da proteína mutante é parcialmente abolido. Em outros casos, o NMD poderia eliminar uma proteína mutante parcialmente activa e, assim, produzir um fenótipo mais grave (120). Portanto, é importante ter em conta o NMD para estabelecer correlações genótipo-fenótipo em doenças hereditárias.

Dois estudos foram feitos sobre NMD em doenças lisossomais de sobrecarga, num examinaram o NMD em linfoblastos derivados de um paciente homozigótico de Tay-Sachs para a mutação *frameshift* comum 1278ins4 (123), e noutro fizeram a análise do NMD em alelos mutantes identificados em pacientes espanhóis da doença de Gaucher (124).

Uma outra forma de interferir com mutações *nonsense* é utilizando aminoglicosídeos. Foi demonstrado que os aminoglicosídeos têm a capacidade de suprimir muitas mutações *nonsense* causadoras de doenças através de um mecanismo que interfere com a leitura dos CTPs pelos ribossomas, ou seja, com o reconhecimento específico dos RNAs de transferência de codões de terminação, permitindo assim a continuação da tradução do mRNA (125, 126). Um estudo demonstrou que, o aminoglicosídeo gentamicina consegue suprimir as mutações *nonsense* mais comuns, W402X e Q70X, do gene *IDUA* (127). Foi descoberto que uma linha celular de fibroblastos do síndrome de Hurler com heterozigotia composta para as mutações *nonsense* W402X e Q70X mostrou um aumento significativo da actividade da α -L-iduronidase quando cultivada na presença da gentamicina, resultando na recuperação de 3% da actividade

normal da α -L-iduronidase. A determinação dos níveis da proteína α -L-iduronidase por um ensaio de imunoquantificação indicou que o tratamento com gentamicina produziu um aumento similar da proteína α -L-iduronidase em células de Hurler. Os níveis residuais de proteína funcional resultantes deste tratamento têm sido correlacionados com fenótipos leves de Hurler. Apesar dos fibroblastos de Hurler conterem um nível de GAGs muito mais elevado do que o normal, observou-se que o tratamento com gentamicina conseguiu reduzir a acumulação de GAGs em células de Hurler até um nível normal. Descobriu-se também que um nível de GAGs reduzido pode ser sustentado pelo menos 2 dias após interromper o tratamento com gentamicina. A redução no nível de GAGs também reflectiu-se numa redução acentuada da vacuolização lisossomal. Tendo em conta estes resultados pode-se concluir que, a supressão de mutações *nonsense* prematuras pode fornecer um tratamento eficaz para pacientes com síndrome de Hurler com mutações *nonsense* prematuras no gene *IDUA* (127).

Estudos anteriores mostraram que a supressão de CTPs, em transcritos de mamíferos, tem potencial para produzir quantidades significativas de proteínas funcionais e corrigir defeitos bioquímicos (127-134). Um estudo mais recente mostrou que uma variedade de mutações *nonsense* do gene *IDUA* pode ser suprimida pela gentamicina em células de mamíferos (135).

A capacidade de suprimir os CTPs do gene *IDUA* constitui uma nova estratégia de tratamento ou potencial terapia suplementar para um grande número de pacientes com MPS I, devido à preponderância das mutações *nonsense* presentes nestes pacientes. Esta estratégia tem o potencial de restabelecer um nível residual de proteína α -L-iduronidase e respectiva actividade. A gentamicina pode atravessar a barreira hemato-encefálica, embora com uma permeabilidade baixa (136), mas um novo composto PTC124 tem sido descrito como sendo mais facilmente absorvido, com menos efeitos colaterais. Esta terapia tem potencial para lidar com a patologia cerebral que não é acessível pela administração intravenosa da terapia de reposição enzimática, e pode ser usada como uma terapia complementar em conjunto com outras terapias estabelecidas, como a terapia de reposição enzimática (135).

Os casos de doença em que os aminoglicosídeos têm-se mostrado eficientes na supressão de mutações *nonsense* incluem fibrose cística (130, 131, 133, 137, 138), distrofia muscular de Duchenne (125, 128, 132, 139), síndrome de Hurler (127, 135), lipofuscinose neuronal infantil (140), cistinose (141), atrofia muscular espinhal (142) e cancro (129). No entanto, para que os aminoglicosídeos possam ser usados clinicamente para terapia de supressão, a sua eficácia deve ser melhorada e a sua toxicidade reduzida. A co-administração de

outros compostos que possam reduzir a toxicidade dos aminoglicosídeos ou o desenvolvimento de novos compostos que consigam suprimir mutações *nonsense*, pode permitir a realização de uma terapia de supressão, como um tratamento clínico, para suprimir mutações *nonsense* causadoras de doenças (143).

Uma vez que existe uma correlação bem definida entre a actividade enzimática e a gravidade do síndrome de Hurler, esta doença é uma boa candidata para examinar se a restauração do nível de expressão da proteína pela supressão de mutações *nonsense* pode reverter os efeitos bioquímicos normalmente associados a uma doença genética humana.

Todos estes resultados indicam que a terapia de supressão de mutações *nonsense* pode ser potencialmente útil para reverter as alterações causadas pela falta de uma enzima de uma via bioquímica. Assim, tanto a terapia com aminoglicosídeos como a terapia com cicloheximida, pode fornecer um tratamento eficaz para muitos pacientes com síndrome de Hurler com mutações *nonsense* no gene *IDUA*, uma vez que o restabelecimento de uma quantidade residual muito baixa dessa enzima pode produzir uma melhoria significativa no fenótipo da doença. No entanto, nenhum estudo clínico tem sido feito de modo a avaliar a capacidade dos aminoglicosídeos no alívio dos sintomas de pacientes com DLSs. Por exemplo, não foi determinado se uma concentração adequada de antibióticos aminoglicosídeos pode atravessar a barreira hemato-encefálica para neutralizar a deterioração mental associada a diversas DLSs (123, 124, 127, 135, 143).

2. Objectivos

Neste trabalho, pretende-se estudar o impacto da mutação W402X do gene *IDUA*, presente na maioria dos doentes com síndrome de Hurler, em dois níveis diferentes: genotípico, determinando a frequência da mutação; e fenotípico, analisando o efeito da mutação. Assim, os principais objectivos deste trabalho foram:

- 1) Determinar a frequência de portadores da mutação W402X do gene *IDUA* na população portuguesa, através de uma amostragem representativa da população em geral e com a utilização de duas abordagens técnicas diferentes, PCR-RFLP e PCR-dHPLC, de forma a tentar encontrar o método mais económico e mais eficaz.
- 2) Estudar alterações polimórficas intragénicas, com o fim de avaliar a possível existência de um haplótipo comum nos alelos mutados detectados.
- 3) Caracterizar funcionalmente a mutação W402X do gene *IDUA* através da avaliação da sua susceptibilidade a mecanismos de supressão de *nonsense* com dois compostos distintos, um aminoglicosídeo, a gentamicina, e um inibidor do NMD, a cicloheximida (CHX), utilizando uma linha celular de um doente homozigótico.

3. Material e Métodos

3.1. Amostras biológicas

As amostras biológicas utilizadas neste trabalho foram:

- Aproximadamente 2000 cartões Guthrie, que consistem em amostras excedentárias de sangue seco em papel de filtro representativo do número de nascimentos em todo o país no período de um ano. Este material excedente anónimo foi gentilmente cedido pelo Programa Nacional de Rastreio Neonatal (Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge - Centro de Genética Médica Dr. Jacinto Magalhães) e foi seleccionado através da geração de códigos aleatórios que apenas identificavam a zona geográfica, de forma a permitir uma amostragem representativa de todo o país. A utilização destas amostras observou as normas nacionais de ética recomendadas.
- Linhas celulares de fibroblastos de controlos normais, de um homozigótico W402X (GM00798) e de um heterozigótico W402X (GM00799). De acordo com os procedimentos éticos, as células utilizadas foram obtidas com o consentimento informado e foram respectivamente numeradas e codificadas de forma anónima. As linhas celulares GM00798 e GM00799 foram obtidas através de um banco de células humanas (*Coriell Institute for Medical Research*).

3.2. Extracção de DNA

Para atingir o primeiro objectivo deste trabalho, aproximadamente 2000 amostras em cartões Guthrie foram recolhidas e o seu DNA foi extraído automaticamente pelo sistema Maxwell 16 (Promega). Foi ainda comparada a qualidade do DNA extraído por este sistema e pelo sistema EZ1 (Qiagen). A quantidade de amostra biológica utilizada consistiu em 2-3 círculos de 2 mm de cartões de sangue seco.

3.3. PCR-RFLP

Para o método de PCR-RFLP, que já é utilizado rotineiramente no diagnóstico da MPS I, utilizamos e optimizamos os PCRs e as condições da análise de RFLP, a fim de reduzir os custos de ensaio. Os PCRs para amplificar o exão 9 do gene *IDUA* foram realizados utilizando ImmoMix Red 2X (Bioline), 20 pmol de primer *forward* Mael-s (5'- AAG CCG GTG CTC ACG GCC ATG - 3'), 20 pmol de primer *reverse* Mael-as (5'- GCG GGT GTC GTC GCT CGC GTA GAT - 3') (Thermo

Scientific) e 5 µl de amostra de DNA em 25 µl de volume final. As reacções de PCR tinham uma desnaturação inicial de 5 minutos a 97°C, seguido por 35 ciclos de amplificação (95°C – 1'; 70°C – 1'; 72°C – 1'30") e uma extensão final de 5 minutos a 72°C (termociclador Tpersonal, Biometra).

O fragmento amplificado, com um tamanho de 435 pb, foi posteriormente submetido à técnica de RFLP, através da digestão com a enzima de restrição Bfal e tampão Tango (Fermentas). Após 16-17 horas de digestão, foi realizada uma electroforese dos produtos da digestão num Gel Agarose NuSieve® a 3% e foram avaliados os padrões de bandas desses produtos, comparando-os com os padrões de bandas dos controlos homozigóticos e heterozigóticos para esta mutação do gene *IDUA*. Nos casos sem a mutação, a Bfal não faz nenhum corte e aparece apenas uma banda de 435 pb no gel; em casos homozigóticos aparecem duas bandas de 135 pb e 300 pb no gel, e em casos heterozigóticos aparecem três bandas de 135 pb, 300 pb e 435 pb.

Todas as amostras com um resultado positivo foram confirmadas por sequenciação, e os resultados obtidos foram submetidos a análise estatística.

3.4. PCR-dHPLC

No caso do método PCR-dHPLC, um protocolo foi recentemente desenvolvido por Kasper e seus colaboradores para a detecção das mutações da α-L-iduronidase que causam MPS I (72). Tentou-se replicar e otimizar o PCR do exão 9 do gene *IDUA* e as condições de análise de dHPLC descritas (72), bem como avaliar a viabilidade da sua aplicação em termos de custos.

3.4.1. Amplificação por PCR

Repetiu-se o mesmo PCR do exão 9 do gene *IDUA* descrito por Kasper e colaboradores (72) e optimizou-se com uma pequena modificação, ou seja, eliminando o uso de *GC clamps* nas sequências dos primers. Para a amplificação do fragmento do exão 9 do gene *IDUA* foi realizado um primeiro PCR para amplificar um fragmento de 379 pb, seguido de um PCR *nested* com um conjunto interno de primers para gerar um amplicão de 208 pb, para posterior análise por dHPLC. A optimização do conjunto de primers foi realizada para o exão 9, gerando fragmentos “limpos” e abundantes, evitando a formação de dímeros de primers. O primeiro PCR foi realizado utilizando PCR MasterMix (Promega), 20 pmol do primer *forward* ID-dH9F (5'- GGA GCG AGT GGT GGG AGG - 3'), 20 pmol do primer *reverse* ID-dH9R (5'- GAC ACT CAG GCC TCG

GCT C-3'), e 4 µl de amostra de DNA, em uma reacção total de 10 µl. O PCR *nested* foi realizado utilizando PCR MasterMix (Promega), 20 pmol do primer *forward* ID-dH9A-F (5' - GGC GGC TGG GCA ACG ACC - 3'), 20 pmol do primer *reverse* ID-dH9A-R (5' - GTG GGC GCG GGT GTC GTC - 3'), e 1 µl da diluição 1/10 do produto do primeiro PCR em 20 µl de volume final. Ambas as reacções de PCR tinham uma desnaturação inicial de 5 minutos a 97°C, seguido por 35 ciclos de amplificação (96°C – 1'; 60°C – 1'; 72°C – 1') e uma extensão final de 10 minutos a 72°C (termociclador TProfessional Basic, Biometra). Após verificação, as amostras foram mantidas a 4°C até a análise por dHPLC ser realizada.

3.4.2. Condições de dHPLC

Optimizaram-se todas as condições de dHPLC (técnica e analítica), a fim de ter uma alta qualidade de detecção da mutação W402X do gene *IDUA* (homozigótico e heterozigótico), de modo a permitir a aplicação do método na identificação de portadores. Os fragmentos dos casos utilizados para a optimização foram primeiro sequenciados, para garantir a ausência de alterações inesperadas.

A análise por dHPLC foi realizada utilizando um sistema automatizado, o WAVE Nucleic Acid Fragment Analysis System (Transgenomic). Antes da análise por dHPLC, os produtos de PCR foram colocados num bloco de termociclador e aquecidos a 96°C por 3 minutos e depois arrefecidos lentamente a 65°C usando uma rampa de decréscimo de 0,1°C para cada 6 segundos (62 ciclos). Os produtos foram posteriormente refrigerados a 4°C. Aplicamos 5 µl de produto de PCR numa coluna de C18-fase invertida (DNASep column, Transgenomic). O DNA foi eluído com um caudal de 0,9 ml/min dentro de um gradiente linear de acetonitrilo consistindo de uma solução Tampão A (0,1 M de acetato de trietilamónio; TEAA) e uma solução Tampão B (0,1 M TEAA, acetonitrilo 25%) e detectado por espectrofotometria com uma absorção de UV a 260 nm. A temperatura ideal para a detecção dos heteroduplexos foi determinada usando o software WaveMaker 3.4 (Transgenomic) e o programa *Melt Program of the Stanford Genome Technology Center* (<http://insertion.stanford.edu/melt.html>). A percentagem de Tampão B foi de 52%, o tempo de execução foi de 8 minutos, e a temperatura da coluna foi de 68,5°C. Após cada corrida, a regeneração da coluna foi conseguida através de uma lavagem com 100% de solução D (Transgenomic) em 30 segundos, seguido por um tempo de equilíbrio de 2 minutos. A presença de heteroduplexos foi indicada por dois ou mais picos no cromatograma, quando a absorvância foi medida contra o tempo. Todos os cromatogramas foram examinados

visualmente por um técnico de laboratório especializado e todos os vestígios foram normalizados de acordo com a sua altura, o tempo de eluição e todos os parâmetros. Qualquer amostra com um padrão de heteroduplexo anormal, obtido na análise por dHPLC, foi amplificada de novo e submetida a sequenciação.

Todas as amostras com um resultado positivo foram confirmadas por sequenciação, e os resultados obtidos foram submetidos a análise estatística, a fim de validar o método.

3.5. Preparação dos produtos de PCR para posterior sequenciação

3.5.1. Amplificação das regiões codificantes do gene *IDUA*

Procedeu-se à amplificação das regiões codificantes do gene *IDUA* de acordo com a Figura 2, com um total de 14 fragmentos.

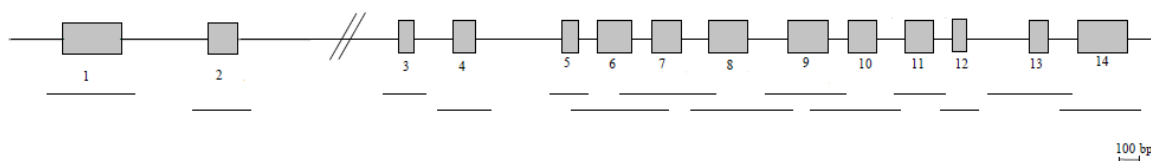


Figura 2 – Esquema representativo dos 14 fragmentos amplificados para sequenciar as regiões codificantes do gene *IDUA* (Adaptado de (54)).

3.5.2. Purificação dos produtos de PCR por método enzimático

Os produtos de PCR foram purificados através de um método enzimático usando o kit ExoSAP-IT® (Affymetrix), de forma a eliminar os primers e os nucleotídeos não incorporados. O procedimento consiste em adicionar, a cada 5 µl de produto de PCR, 2 µl de ExoSAP-IT®, incubar a 37°C durante 15 minutos, terminando com uma inativação final de 15 minutos a 80°C.

3.5.3. Reacção de sequenciação

Para a preparação da reacção de sequenciação automática utilizou-se a mistura comercial BigDye® Terminator Cycle Sequencing kit2.0 (ABI PRISM, PE Applied Biosystems), que é constituída por MgCl₂, dNTPS, ddNTPS marcados com 4 fluorocromos distintos, uma solução tampão e uma AmpliTaq DNA Polimerase. A 2 µl desta mistura adicionou-se 0,65 µl de

primer (*Forward* ou *Reverse*) a 1,6 pmol/μl, 2 μl de produto de PCR purificado e água para um volume final de 10 μl.

A amplificação foi efectuada com o programa de PCR que inclui uma desnaturação inicial de 3 minutos a 94°C, seguido por 25 ciclos de amplificação (96°C – 10"; 50°C – 5"; 60°C – 4'), no termociclador TPersonal (Biometra).

3.5.4. Purificação dos produtos de sequenciação

Os produtos obtidos, após o PCR de sequenciação, foram purificados em colunas de Sephadex 7% (GE Healthcare), com o objectivo de eliminar os dNTPs e ddNTPs não incorporados e também sais que pudessem interferir com a electroforese capilar. O procedimento iniciou-se com uma centrifugação de 3500 g durante 4 minutos (Centrifuga Biofuge Pico, Heraeus) para assim retirar o excesso de água da resina, em seguida adicionou-se a amostra à resina e centrifugou-se novamente a 3500 g durante 4 minutos. Deixou-se secar a 80°C durante 15 minutos e ressuspendeu-se com 20 μl de Hi-Di Formamida Desionizada (Applied Biosystems) por agitação em vortex e dissolução completa à temperatura ambiente durante 10 minutos.

3.5.5. Sequenciação dos fragmentos

A análise dos fragmentos foi realizada por electroforese capilar no sequenciador automático ABI PRISM 3130xl (Applied Biosystems) e os resultados foram analisados no programa Chromas 2.33 (Technelysium Pty Ltd).

3.6. Pesquisa de SNPs nos casos portadores identificados

Para fazer o estudo de alterações polimórficas intragénicas, com o fim de avaliar a possível existência de um haplótipo comum nos alelos mutados detectados pela técnica de PCR-RFLP e pela técnica de PCR-dHPLC, foi realizada uma pesquisa de SNPs descritos como associados à mutação W402X. De entre os vários SNPs que podem-se encontrar no gene *IDUA*, seleccionaram-se 6 SNPs (Tabela 3) que têm sido encontrados com mais frequência em doentes MPS IH com a mutação W402X (54, 144-146), e procedeu-se à amplificação e posterior sequenciação dos exões onde se encontram estes 6 SNPs. Os primers usados na amplificação e na sequenciação dos exões 1, 3 e 7, e as condições de PCR usadas na amplificação dos exões estão indicados nas Tabelas 4 e 5, respectivamente.

Tabela 3 – Características dos SNPs que normalmente encontram-se associados a mutação W402X.

SNP	Referência SNP	cDNA	Exão
A8A	rs11248061	c.24 C >A	1
A12A	não atribuído	c.36 G >N	
A20A	rs10902762	c.60 G >A	
Q33H	rs10794537	c.99 T >G	
L118L	rs3755954	c.352 C >T	3
N297N	rs114806891	c.891 C >T	7

Tabela 4 – Primers utilizados na amplificação dos exões 1, 3 e 7 do gene *IDUA*.

Exão	Designação	Sequência (5' → 3')	Tamanho (nt)	T _m (°C)	Tamanho produto PCR (pb)
1	1IDs	CAGTGCAGCCCGAAGCCCCGCAGT	24	72	283
	1IDAs	TGAAGCTCTCACAGTGCAGTCA	24	61,9	
3	3IDs	CCCTGCTTCTGACGCTG	18	53,9	211
	3IDAs	GACATCCAAGGACTCAGA	18	41,1	
7	7IDs	CGCCCTCAGCCGCTGTGC	18	62,3	315
	7IDAs	GCCACCGCTCGCCTGTCC	18	61,1	

Tabela 5 – Condições de PCR utilizadas na amplificação dos exões 1, 3 e 7 do gene *IDUA*.

Exão	Mix utilizado	Programa PCR
1	Promega Mix	97°C – 5' 35x (95°C – 1'; 60°C – 1'; 72°C – 1') 72°C – 5'
3	Promega Mix	95°C – 5' 8x (95°C – 30"; 50°C – 30"; 72°C – 30") 72°C – 5' 95°C – 5' 35x (95°C – 30"; 55°C – 30"; 72°C – 30") 72°C – 5'
7	ImmoMix Red	97°C – 5' 35x (95°C – 1'; 68°C – 1'; 72°C – 1') 72°C – 5'

3.7. Análise do efeito de supressão da mutação *nonsense* W402X

Para atingir o terceiro objectivo deste trabalho, usaram-se linhas celulares de fibroblastos para verificar e comparar os efeitos de diferentes compostos conhecidos por interferir com mutações *nonsense*.

Realizaram-se experiências de terapia de supressão de mutações *nonsense* em linhas de células de fibroblastos homozigóticos e heterozigóticos do síndrome de Hurler para a mutação *nonsense* W402X do gene *IDUA*, onde estudaram-se os efeitos da gentamicina e da cicloheximida (CHX).

3.7.1. Cultura de Células

Antes dos ensaios experimentais com culturas de células, o gene *IDUA* de todas as linhas celulares usadas foi sequenciado, a fim de confirmar a presença ou ausência do genótipo desejável.

Todas as linhas celulares de fibroblastos foram mantidas em cultura em meio completo (DMEM, Dullbecco's, Gibco) suplementado com 10% de soro vitelo fetal (SVF, Lonza) e 1% de fungizona (Gibco), sem antibióticos, numa estufa a 37°C e com uma atmosfera humidificada com 5% de CO₂. O meio de cultura foi sendo renovado de quatro em quatro dias e sempre que necessário procedeu-se à expansão da cultura por tripsinização.

A viabilidade e a densidade das células em cultura foram avaliadas pelo método de azul de tripan.

3.7.2. Crioconservação das linhas celulares de fibroblastos

Todas as linhas celulares de fibroblastos foram crioconservadas em azoto líquido, para evitar a perda destas linhas celulares por contaminação com bactérias ou fungos, por envelhecimento ou mesmo por transformação.

O procedimento para crioconservar uma linha celular iniciou-se com a tripsinização das células adicionando cerca de 1 ml de tripsina aquecida a 37°C, e após o destacamento das células, fez-se a inactivação da tripsina com 2 ml de meio completo enriquecido com 10% de SVF. Transferiu-se a suspensão celular para um tubo de 15 ml e centrifugou-se durante 10 minutos a 1600 rpm (Centrifuga Megafure 1.0R, Heraeus Instruments). Rejeitou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o pellet de células com 1,5-2 ml de meio de crioconservação (meio completo enriquecido com 10% de SVF e 10% de DMSO, que foi preparado e mantido a

4°C). Transferiu-se para uma ampola de criopreservação (criotubo; Greiner Bio-one) e colocou-se em gelo durante 30 minutos. Encheu-se a caixa de congelamento (Mr. Frosty™, Thermo Scientific) com 250 ml de 2-propanol e colocou-se a ampola no interior da caixa durante pelo menos 4 horas a -70°C. Por fim, transferiu-se a ampola para um reservatório de azoto líquido.

3.7.3. Reposição em cultura das linhas celulares de fibroblastos criopreservadas

Quando foi necessário repor em cultura qualquer uma das linhas celulares de fibroblastos criopreservadas, retirou-se o criotubo respectivo do reservatório de azoto líquido e colocou-se o criotubo em gelo a descongelar lentamente durante 30 minutos. Depois de ter descongelado parcialmente retirou-se a suspensão de células do criotubo, e adicionou-se esta suspensão a cerca de 8 ml de meio base a 4°C. Centrifugou-se a 1200 rpm (Centrifuga Megafure 1.0R, Heraeus Instruments) durante 10 minutos e rejeitou-se o sobrenadante. Ressuspendeu-se o pellet em 2 ml de meio completo enriquecido com 10% SVF e transferiu-se a suspensão celular para uma caixa pequena (25 cm³), e adicionou-se mais 3 ml de meio completo enriquecido com 10% SVF. As células geralmente aderem passado 24 horas e é efectuada a observação ao microscópio no dia seguinte para avaliar a evolução das células.

3.7.4. Experiências de supressão da mutação *nonsense* W402X

As experiências foram realizadas com fibroblastos em cultura apresentando aproximadamente 60-70% de confluência e uma viabilidade celular de 70-80%, tal como determinado pelo método de azul de tripan. Cada linha celular foi subdividida e submetida a tratamento com apenas um composto, gentamicina ou cicloheximida (CHX). Os ensaios foram realizados de forma independente e em paralelo com as subculturas não tratadas. As linhas celulares utilizadas tinham entre 10 e 12 passagens.

Concentrações variáveis e diferentes tempos de incubação foram usados, começando com a gentamicina ou a cicloheximida a 100 µg/ml em cada caso (Tabela 6). As células foram recolhidas a uma densidade aproximada de 5x10⁵.

Tabela 6 – Diferentes concentrações e tempos de incubação dos antibióticos utilizados.

Antibiótico	Concentração (µg/ml)	Tempo de incubação (h)
Gentamicina	100	24
	600	
Cicloheximida	100	8
	600	

3.7.5. Obtenção de *pellet* celular de fibroblastos

Após a realização dos ensaios nas diferentes culturas celulares, procedeu-se à obtenção dos respectivos *pellets* para posterior extracção de RNA e quantificação relativa da expressão do gene *IDUA*.

Para obtenção de um *pellet* celular, as células foram lavadas com PBS 1X (diluído a partir de uma solução de PBS 10X, Lonza), tripsinizadas com 1 ml de tripsina (Gibco) durante 3-5 minutos a 37°C e centrifugadas a 2250 rpm durante 10 minutos (Centrifuga Megafure 1.0R, Heraeus Instruments). Após uma segunda lavagem com PBS, o *pellet* de células foi preservado a -20°C.

3.7.6. Extracção de RNA e síntese de cDNA

A extracção de RNA foi realizada a partir dos *pellets* de fibroblastos que tinham sido obtidos anteriormente e congelados a -20°C, utilizando o kit High Pure RNA Isolation (Roche) e seguindo o protocolo descrito pelo fabricante.

Seguidamente, a partir do RNA total, realizou-se a síntese de cDNA utilizando o kit qScript™ cDNA SuperMix (Quanta Biosciences). Seguiu-se o protocolo descrito pelo fabricante, onde a 16 µl de RNA adicionou-se 4 µl de qScript cDNA SuperMix (5X), e colocou-se a incubar num termociclador Tpersonal (Biometra) com o seguinte programa: 5 minutos a 25°C; 30 minutos a 42°C; e por fim 5 minutos a 85°C. Depois de sintetizar-se o cDNA, as amostras foram guardadas a -20°C até ao momento da análise.

A determinação das concentrações (ng/µl) e da pureza do RNA e do cDNA obtidos foi realizada por quantificação num espectrofotómetro UV-Vis NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific).

3.7.7. Análise do mRNA por PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR)

O PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR), utilizando o método TaqMan®, é um PCR quantitativo utilizando sondas que imitem fluorescência, de modo a permitir a amplificação e a quantificação de uma sequência de DNA alvo, em tempo real. O aumento da fluorescência é proporcional à quantidade de produto de PCR. Numa reacção de qRT-PCR a emissão de fluorescência, proveniente da mistura de reacção ou das sondas utilizadas, é registada pelo sistema do aparelho e pode ser visualizada ao longo do progresso da reacção de PCR. As reacções de qRT-PCR caracterizam-se pelo período de tempo onde a amplificação do fragmento desejado é inicialmente detectada (após um período inicial com fluorescência abaixo do limite de detecção) e apresentam uma fase exponencial, seguida de uma fase de *plateau*, em que as condições de reacção tornam-se limitantes, deixando de haver aumento de emissão de fluorescência.

A metodologia para quantificação relativa, usando o qRT-PCR, pode ser feita em relação a uma curva padrão ou em congruência com um ou mais controlos co-amplificados. A utilização de controlos externos pode introduzir um maior grau de variabilidade, requerendo o teste de vários genes controlo, o que torna-se mais dispendioso e demorado. Apesar da aparente simplicidade desta técnica, há alguns aspectos críticos a considerar, nomeadamente: a qualidade da amostra a ser usada, a sensibilidade e especificidade do ensaio e a inclusão de controlos negativos (de modo a evitar falsos positivos), para que haja concordância entre as várias réplicas e as diferentes experiências que se façam.

Para verificar-se, se houve recuperação de mRNA ou aumento da expressão do gene *IDUA*, fez-se a quantificação relativa dos vários cDNAs sintetizados por PCR em tempo real (qRT-PCR) no aparelho ABI PRISM 7000 (Applied Biosystems). Para minorar a possibilidade de variabilidade introduzida através de uma curva com concentrações pré-determinadas, as amostras utilizadas foram todas tratadas da mesma forma. As condições básicas de cultura celular, a extracção de RNA, e a síntese de cDNA foram todas efectuadas em condições idênticas, tanto nos controlos, como nos casos em estudo. Uma vez que pretende-se analisar a resposta de um tipo de células (homozigóticas para W402X) face à exposição a dois agentes que interferem, potencialmente, com esse tipo de mutação, é possível efectuar essa comparação traçando uma curva padrão e comparando-a com os resultados obtidos experimentalmente. Neste caso utilizou-se como “calibrador” uma *pool* de amostras controlo não submetidas a tratamento. A utilização de uma *pool* permite uma melhor aferição dos resultados pois permite

diminuir a influência de qualquer pequena variação existente nas amostras controlo. Para a preparação das curvas e execução das experiências, todas as amostras foram quantificadas e submetidas a diluições segundo factores conhecidos.

As experiências foram realizadas utilizando placas de 96 poços e um aparelho ABI PRISM 7000 (Applied Biosystems). Os ensaios foram efectuados em triplicado e preparados de forma a inserir controlos negativos entre as amostras e ao longo das placas. Para cada amostra (respectivo cDNA), as quantidades de cada um dos componentes do *Mix* para a reacção de qRT-PCR estão descritas na Tabela 7.

Tabela 7 – Quantidades dos diferentes componentes do *Mix* para a reacção de qRT-PCR.

Componente do <i>Mix</i> para a reacção de qRT-PCR	Volume para 20 µl de reacção (µl)
Sonda Hs00164940_m1 [20X]*	1
cDNA	0,5
H ₂ O	8,5
TaqMan® Universal Master Mix*	10

* Applied Biosystems

Depois de preparada a placa com todas as amostras, os parâmetros de corrida da reacção de qRT-PCR foram: aquecimento inicial de 50°C durante 2 minutos, seguido de outro aquecimento a 95°C durante 10 minutos e depois 40 ciclos (95°C – 15"; 60°C – 1').

4. Resultados

4.1. Extracção de DNA

O DNA extraído de 2-3 círculos correspondeu a 250 ng. No caso de amostras extraídas com EZ1 (Qiagen) o grau de pureza foi variável, enquanto que o obtido com o Maxwell (Promega) rondou consistentemente o valor ideal de 1,8 (A260/A280), razão pela qual se utilizou este último sistema semi-automático de extracção de ácidos nucleicos.

4.2. PCR-RFLP

Com as condições de amplificação descritas no ponto 3.3 foi possível amplificar o exão 9 do gene *IDUA*, como se verifica na Figura 3. Uma vez optimizada e verificada a qualidade da amplificação do exão 9, amplificaram-se 1536 amostras de DNA extraídas de sangue seco. A presença da mutação dá origem a um local de reconhecimento para a enzima de restrição Bfal (5'...C[^]TAG...3') no amplicão utilizado. Assim, esta enzima foi utilizada na análise das amostras pela técnica de RFLP. Como se verifica na Figura 4, após os produtos de PCR serem digeridos pela enzima Bfal, é possível observar que o controlo homozigótico apresenta duas bandas (135 e 300 pb), os indivíduos heterozigóticos apresentam um padrão com três bandas (135, 300 e 435 pb) e as amostras normais, sem a mutação, apresentam apenas uma banda (435 pb).

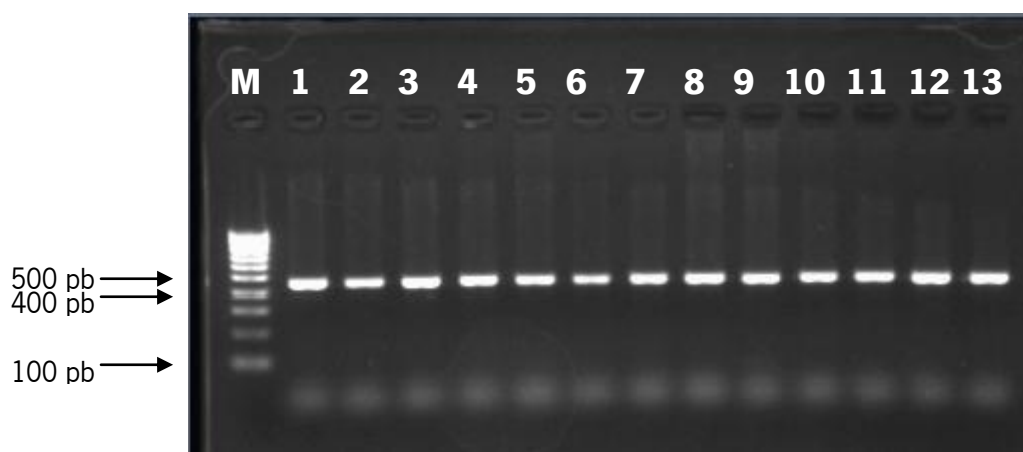


Figura 3 – Resultado da amplificação do exão 9 do gene *IDUA* de diferentes amostras; 1-13 – amostras de DNA; M – marcador de peso molecular 100 pb (HyperLadder™ IV, Bioline).

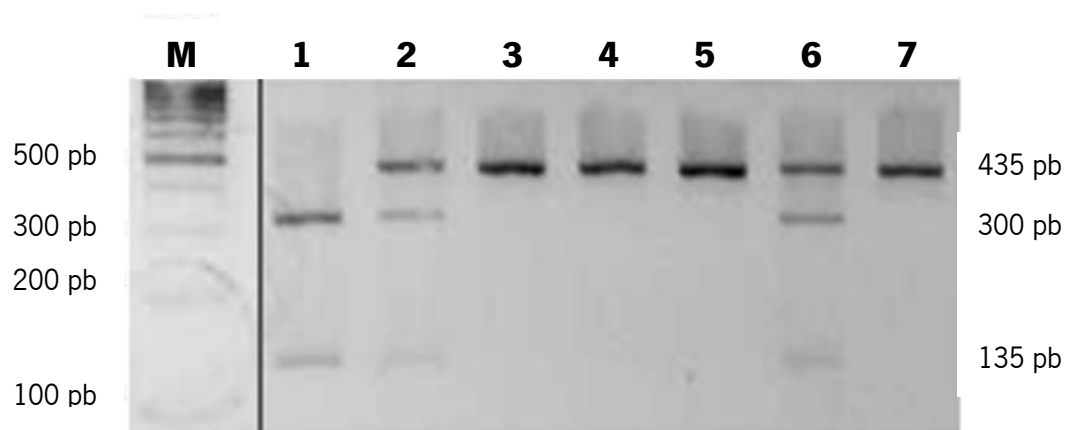


Figura 4 – Resultado da digestão com BfaI do exão 9 do gene *IDUA* de diferentes amostras; 1- controlo homozigótico; 2- controlo heterozigótico; 3 ao 7 - amostras de DNA (6 – amostra de portador); M – marcador de peso molecular 100 pb (HyperLadder™ IV, Bioline).

Nestas 1536 amostras de DNA foram encontrados, com o método de PCR-RFLP, sete casos de portadores da mutação W402X do gene *IDUA*.

4.3. PCR-dHPLC

A amplificação e as condições de dHPLC do exão 9 do gene *IDUA* foram inicialmente testadas em amostras de controlos normal, homozigótico e heterozigótico de DNA genómico para a mutação W402X, causadora da doença. Após a optimização do protocolo de PCR (Figura 5), amplificaram-se 500 amostras de DNA que foram posteriormente analisadas pela técnica de dHPLC.



Figura 5 – Resultado da amplificação do exão 9 do gene *IDUA* de diferentes amostras para depois ser analisado por dHPLC; 1-13 – amostras de DNA; M – marcador de peso molecular 100 pb (HyperLadder™ IV, Bioline).

A temperatura ideal de desnaturação parcial para o exão 9 foi determinada testando duas temperaturas diferentes, 68,0°C e 68,5°C, e verificou-se que com 68,5°C obtinha-se perfis de dHPLC das amostras de DNA de controle muito melhores. No caso da percentagem do Tampão B, testaram-se duas percentagens diferentes, 51% e 52%. Observou-se que, com uma percentagem de 52% de Tampão B, obteve-se uma resolução melhor dos perfis de dHPLC e estes apareciam no início do tempo de execução da técnica. Posteriormente, fez-se uma análise por dHPLC dos produtos de PCR com a mutação W402X do gene *IDUA*, para validar a técnica e foram obtidos perfis distintos de dHPLC para cada variante de DNA. Verificou-se que, com esta técnica de dHPLC consegue-se detectar facilmente um perfil anormal de dHPLC de um heterozigótico para a mutação W402X (Figura 6). Além disso, outros quatro perfis anormais de dHPLC foram detectados (Figura 6), correspondendo a homozigóticos para o SNP T410T, heterozigóticos para o SNP T410T, homozigóticos para o SNP G409R, e heterozigóticos para o SNP G409R. Comparando os perfis de dHPLC de exões portadores da mutação W402X, observou-se que eles são diferentes dos obtidos para os exões que possuem os SNPs T410T ou G409R. Contudo, quando comparam-se os perfis de dHPLC dos exões que possuem o SNP T410T e os exões que possuem o SNP G409R, não se consegue ver qualquer diferença entre estes dois perfis de dHPLC, o que pode estar relacionado com o facto de esses dois SNPs se encontrarem em locais adjacentes e partilharem uma troca idêntica de nucleotídeos (G-C). Assim, em condições parciais de desnaturação, as amostras comportam-se de forma semelhante. Esta caracterização dos cinco tipos diferentes de perfis de dHPLC foi feita após a sequenciação das amostras que apresentaram os diferentes tipos de perfil de dHPLC.

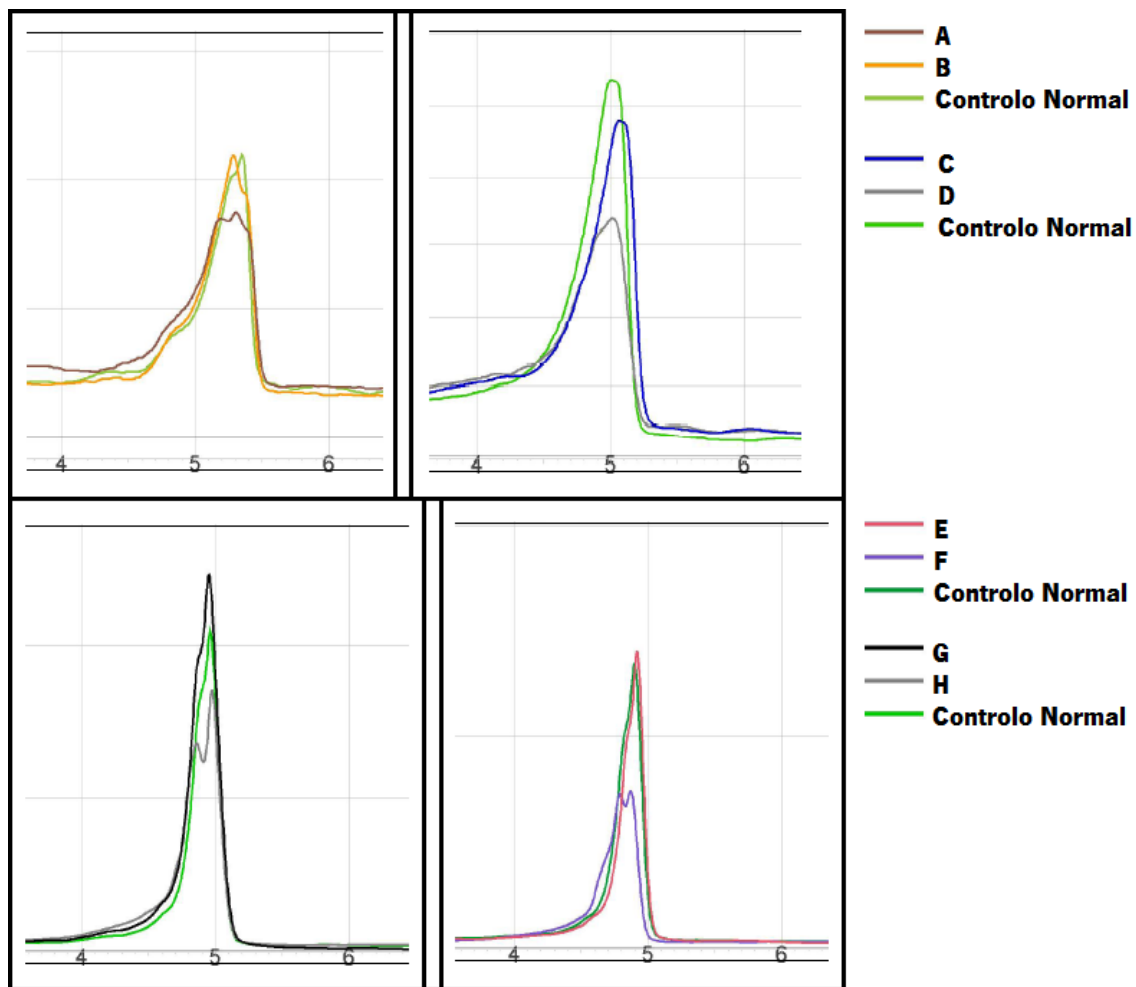


Figura 6 – Diferentes perfis de dHPLC do exão 9 do gene *IDUA*; A – SNP T410T (Hetero); B – SNP T410T (Homo); D – SNP G409R (Homo); F – SNP G409R (Hetero); H – W402X (Hetero); C, E e G – amostras normais.

Neste pequeno *screening* de um total de 500 amostras de DNA, obtiveram-se 342 amostras normais (68,4%), 144 heterozigóticos para o SNP T410T (28,8%), 11 homozigóticos para o SNP T410T (2,2%), um heterozigótico para o SNP G409R (0,2%), um homozigótico para o SNP G409R (0,2%) e um heterozigótico para a mutação W402X do gene *IDUA* (0,2%) (Figura 7).

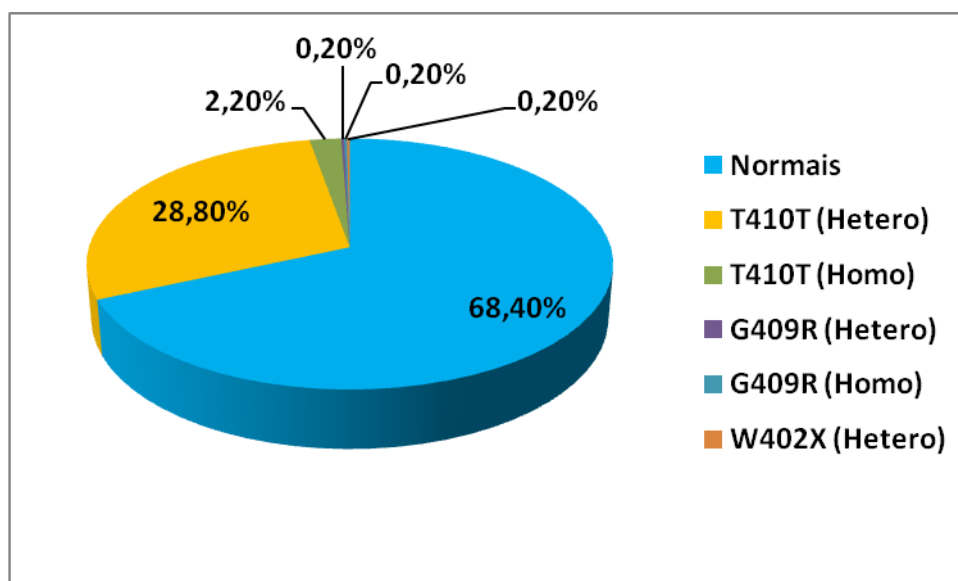


Figura 7 – Gráfico com as percentagens obtidas dos diferentes SNPs encontrados na análise por dHPLC.

Em termos de frequência alélica o SNP T410T, que foi o de maior frequência nesta amostragem, apresenta uma frequência de 17% para a forma alélica c.20776C\G. esta frequência é muito semelhante à de 16-18% que se encontra descrita para o alelo de menor frequência (c.2077G\G).

4.4. Determinação da frequência da mutação W402X

Na Tabela 8 estão resumidos os resultados obtidos na determinação da frequência de portadores efectuada na população portuguesa. Este é o primeiro estudo em que se determina a frequência desta mutação causal numa população específica.

Tabela 8 – Despiste da mutação mais frequente no gene *IDUA* na população portuguesa em geral: W402X.

Indivíduos testados (nº total)	2036
Nº heterozigóticos observado	8
Frequência alélica (%) (IC)	0,20 (0,08-0,39)
Frequência de portadores por 10000 (IC)	39 (17-77)

IC: intervalo de confiança de 95% (calculado de acordo com (147, 148)).

Todos os portadores da mutação W402X identificados, pelas duas técnicas utilizadas, foram confirmados por sequenciação (Figura 8).

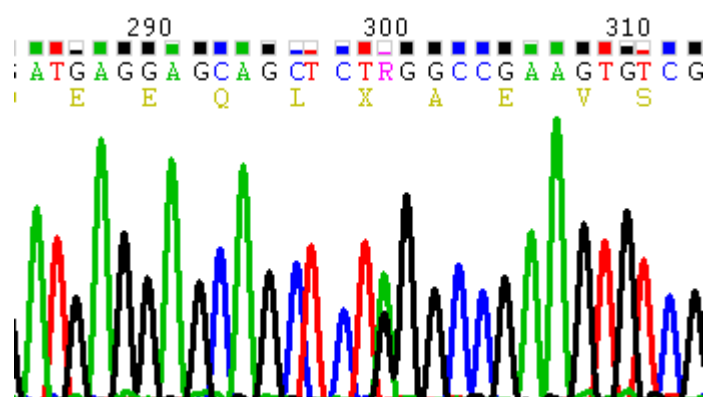


Figura 8 – Sequenciação do exão 9 do gene *IDUA* de um dos portadores da mutação W402X (TR(G>A)G).

A frequência alélica encontrada é indicativa da existência de cerca de 40 doentes homozigóticos na nossa população, o que significa que poderá haver cerca de 30% de doentes de Hurler por diagnosticar ou com diagnóstico médico errado.

4.5. Pesquisa de SNPs nos casos de portadores identificados

No estudo das alterações polimórficas intragénicas nos alelos mutados detectados pela técnica de PCR-RFLP e pela técnica de PCR-dHPLC, verificou-se que existiam 3 haplótipos diferentes (Tabela 9). O haplótipo 1 foi encontrado em 5 portadores da mutação W402X (62,5%), o haplótipo 2 foi encontrado em 2 portadores (25%) e por fim, um dos portadores possuía o haplótipo 3 (12,5%) (Figura 9). A alteração Q33H é a única que encontra-se presente em todos os casos, aparecendo na forma ancestral c.99G.

Tabela 9 – Os diferentes haplótipos encontrados nos alelos mutados.

Haplótipos	SNPs	Casos portadores
1	A8A; A20A; Q33H	5
2	Q33H; N297N	2
3	A8A; A20A; Q33H; N297N	1

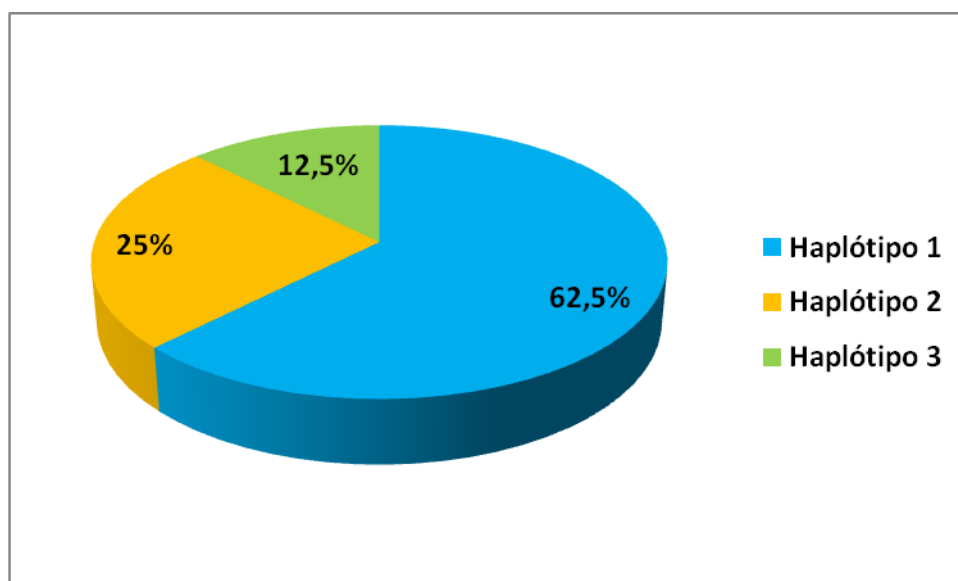


Figura 9 – Gráfico com as percentagens obtidas dos diferentes haplótipos encontrados nos portadores da mutação W402X.

4.6. Análise do efeito de supressão da mutação *nonsense* W402X

Antes de começar-se com os ensaios experimentais, sequenciou-se a totalidade do gene *IDUA* de todas as linhas celulares de fibroblastos utilizadas, a fim de confirmar a presença ou ausência do genótipo desejável. Verificou-se então que as linhas celulares de fibroblastos GM00798 e GM00799 apresentavam no seu genótipo a mutação W402X em homozigotia e heterozigotia, respectivamente, enquanto que as linhas celulares de fibroblastos de controlos normais não apresentavam a mutação W402X. Adicionalmente, foi detectado no genótipo das linhas celulares de fibroblastos GM00798 e GM00799, a presença do SNP Q33H no exão 1 do gene *IDUA*, em homozigotia e heterozigotia, respectivamente.

Depois da realização dos ensaios experimentais nas diferentes culturas celulares, não se observaram alterações morfológicas das células, visíveis ao microscópio, que fossem indicativas de efeitos tóxicos nas células devido à exposição aos antibióticos utilizados. Após as incubações de 8 horas com cicloheximida (CHX) e 24 horas com gentamicina, procedeu-se à obtenção dos respectivos *pellets* para posterior extracção de RNA e síntese de cDNA. Determinou-se as concentrações dos cDNAs sintetizados que variaram entre 850 e 1100 ng/μl.

Para se verificar se houve recuperação de mRNA ou aumento da expressão do gene *IDUA*, fez-se a quantificação relativa dos vários cDNAs sintetizados por qRT-PCR no aparelho ABI PRISM 7000 (Applied Biosystems), tendo-se obtido os resultados descritos na Tabela 10. A quantificação relativa dos vários cDNAs sintetizados por qRT-PCR foi obtida comparando as diferentes curvas de amplificação do cDNA das linhas celulares submetidas, ou não, ao

tratamento, com as curvas de amplificação do cDNA das diluições sucessivas da *pool* de amostras controlo não submetidas a tratamento. O cálculo efectuou-se utilizando os respectivos valores de C_t (*threshold cycle*), de acordo com o “método da curva padrão relativa” (“*relative standard curve*”), ou seja, usando a equação da recta padrão determinada pelo aparelho (Figura 10).

Tabela 10 – Quantificação relativa (ng/ μ l) dos vários cDNAs sintetizados por qRT-PCR no aparelho ABI PRISM 7000 (Applied Biosystems).

Linha Celular	Sem tratamento	C100	C100x	C600	C600x	G100	G100x	G600	G600x
798A	356,1	924,0	2,59	931,2	2,61	840,3	2,36	341,4	0,96
799A	754,3	2733,8	3,62	2145,6	2,84	1507,6	2,00	2851,8	3,78
CTA	1100,0	6154,1	5,59	4702,8	4,28	2821,3	2,56	3671,6	3,34

Legenda: C= Cicloheximida; G= Gentamicina; x= diferença de expressão (tratamento/sem tratamento).

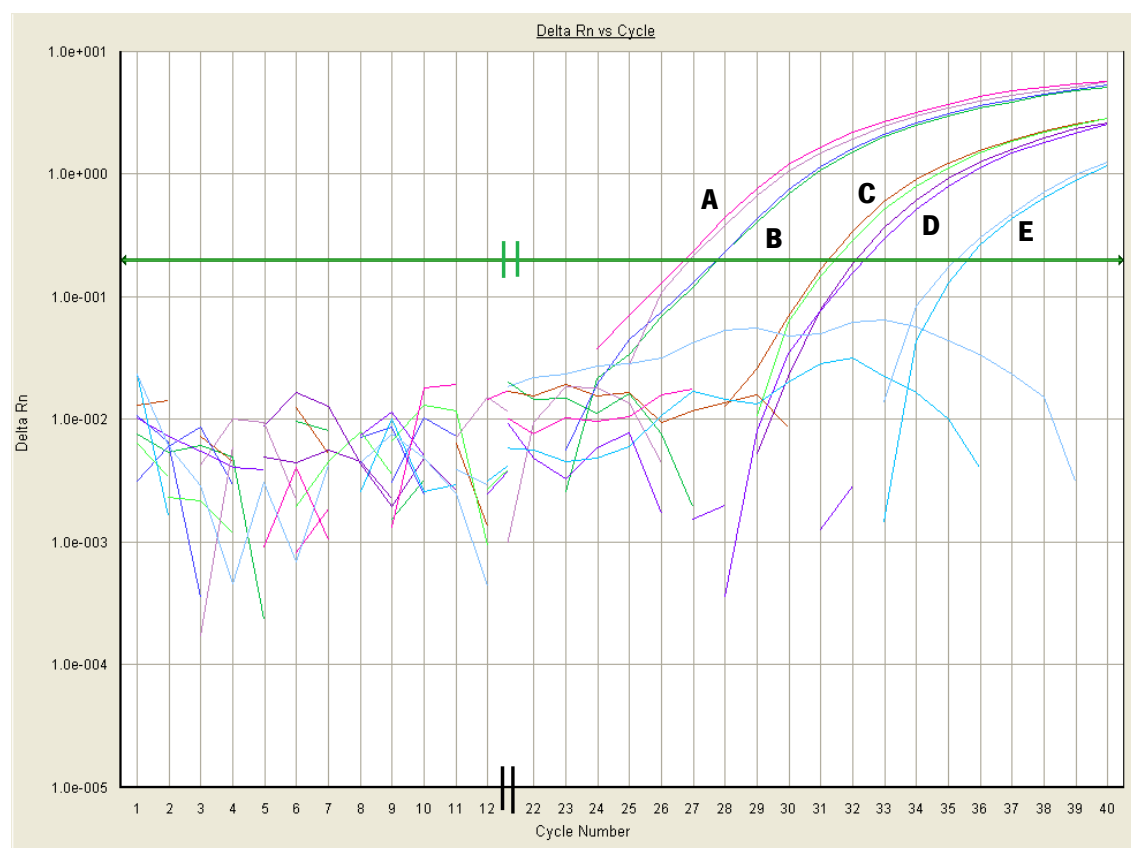


Figura 10 – Curvas de amplificação do cDNA das diluições sucessivas (A= 1:1; B= 1:2; C=1:10; D= 1:20; E= 1:100) da pool de amostras controlo não submetidas a tratamento (Equação da recta padrão: $y = -4,371940 \log x + 40,035328$; $R^2 = 0,99$).

Na Figura 11, pode-se observar as diferenças no nível de expressão do gene *IDUA* obtido nas linhas celulares utilizadas e submetidas a tratamento com dois agentes químicos diferentes

e em duas condições diferentes. Duas concentrações diferentes de cicloheximida (CHX) ou gentamicina foram utilizadas nos tratamentos.

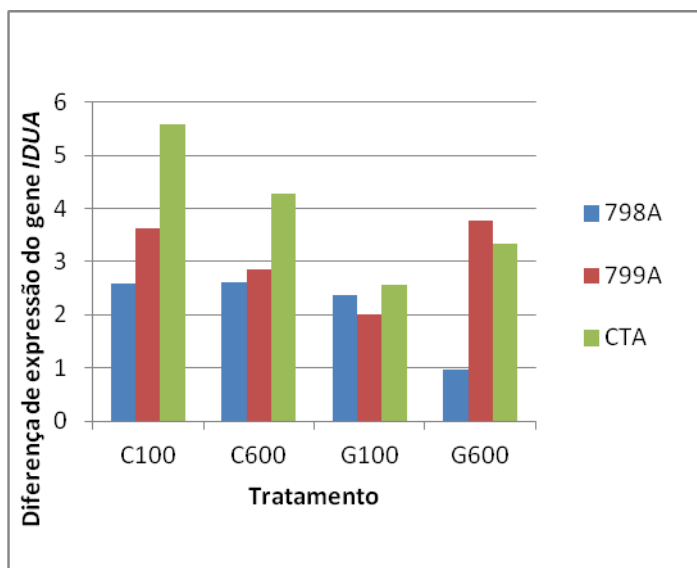


Figura 11 – Gráfico com as diferenças no nível de expressão do gene *IDUA* obtido nas linhas celulares utilizadas e submetidas a duas concentrações diferentes de cicloheximida ou gentamicina.

No caso do tratamento com 100 µg/ml de cicloheximida (C100) verificou-se um aumento na expressão do gene *IDUA* em todas as linhas celulares, sendo esse aumento de expressão na linha celular GM00798 (798A) de 2-3 vezes, na linha celular GM00799 (799A) de 3-4 vezes e na linha celular controlo (CTA) de 5-6 vezes. No tratamento com 600 µg/ml de cicloheximida (C600) também verificou-se um aumento na expressão do gene *IDUA* em todas as linhas celulares, sendo esse aumento de expressão nas linhas celulares GM00798 (798A) e GM00799 (799A) de 2-3 vezes e na linha celular controlo (CTA) de cerca de 4 vezes. Por outro lado, no caso do tratamento com 100 µg/ml de gentamicina (G100) verificou-se um aumento idêntico na expressão do gene *IDUA* em todas as linhas celulares, sendo esse aumento de expressão na ordem de 2-3 vezes. Enquanto que, no tratamento com 600 µg/ml de gentamicina (G600) constatou-se um aumento na expressão do gene *IDUA* na linha celular GM00799 (799A) e na linha celular controlo (CTA), na ordem de 3-4 vezes, contudo, na linha celular GM00798 (798A) não verificou-se qualquer diferença ao nível da expressão do gene *IDUA*.

5. Discussão

Apesar da existência de mais de 100 mutações causais da doença MPS I, a mutação W402X é a causa genética mais frequente desta doença. A homozigotia para a mutação W402X está associada com o fenótipo clínico mais grave (síndrome de Hurler, MPS IH), sendo que, a relevância do estudo e do rastreio rápido desta mutação é evidenciada pelo facto de tratar-se de uma mutação pan-europeia, relacionada com um fenótipo grave, e de ser importante aferir a sua frequência para melhor compreender a existência, ou não, de um risco acrescido na nossa população.

Por rotina, a genotipagem e o diagnóstico da mutação W402X do gene *IDUA* é realizada por digestão com uma endonuclease de restrição e posterior electroforese em géis de agarose. Neste estudo a análise por RFLP com a enzima Bfal foi um procedimento útil e simples para a detecção da mutação W402X no gene *IDUA*. No entanto, esta torna-se uma abordagem morosa quando pretende-se estudar um grande número de amostras, como no trabalho presente. Neste caso, devido ao tipo de fragmento, não era exequível a detecção da mutação por discriminação alélica por PCR em tempo real. Assim, desenvolveu-se uma abordagem alternativa através do aperfeiçoamento de uma abordagem por PCR-dHPLC.

Os pontos cruciais no desenvolvimento do método PCR-dHPLC são a optimização do PCR, a fim de obter fragmentos limpos, e a necessidade de experiência e cuidado na verificação e interpretação dos diferentes perfis de dHPLC. Através de pequenas modificações da abordagem proposta por Kasper e seus colaboradores (72), conseguiu-se melhorar e otimizar os perfis de dHPLC dos controlos e das amostras. Com as alterações introduzidas, a sensibilidade do método de dHPLC para a análise da mutação W402X foi consideravelmente aumentada. Foi também possível a detecção, na proximidade desta mutação, de transversões C-G, o que contraria o facto referido por Xiao, segundo o qual em condições completamente desnaturantes é possível resolver todas as substituições de bases possíveis, com a excepção das transversões C-G (68).

Através da técnica de dHPLC não só identificou-se a mutação em estudo, mas também reconheceu-se os padrões correspondentes a todas as alterações existentes no fragmento amplificado. Utilizando a técnica de RFLP apenas detectou-se a mutação pretendida, sendo ainda necessário considerar a possibilidade de poderem existir falsos negativos devido a digestão incompleta.

Conseguiu-se, portanto, melhorar e desenvolver um método de despiste para a detecção por dHPLC da mutação W402X e de SNPs em torno desta mutação do gene *IDUA*. A técnica de dHPLC é uma ferramenta muito útil para uma detecção rápida, eficiente, e de baixo custo da mutação W402X, revelando ser um método robusto, automatizável, económico e acima de tudo, altamente sensível. Usando este método de dHPLC como uma ferramenta pré-analítica, seguida de sequenciação dos fragmentos com perfis anormais de heteroduplexos, o custo para a detecção da mutação W402X e de outras mutações causais da doença MPS I pode ser reduzido pois, possuindo um aparelho de dHPLC na instituição, a parte laboratorial é de fácil e rápida execução.

Determinou-se a frequência de portadores da mutação W402X do gene *IDUA* numa amostragem de 2036 indivíduos representativos da população portuguesa, utilizando dois métodos diferentes. A frequência alélica na nossa população é de 0,20% (IC: 0,08-0,39), o que leva a crer que possa existir um total de cerca de 40 doentes homozigóticos em Portugal. Assim, e face à casuística conhecida (62), existiriam cerca de 30% de doentes com a forma mais grave de MPS I incorrectamente diagnosticados como sofrendo de outra patologia.

Em 2001, a frequência alélica determinada para a mutação W402X em doentes com MPS I era de 63% (62), muito superior à média europeia de 37% (50). No entanto, esta frequência alélica da mutação W402X é muito idêntica à encontrada em Espanha, 60% (51), e ao comparar as frequências em homozigotia e em heterozigotia, verifica-se que em Espanha são de 40% e 20%, respectivamente, e em Portugal são de 47% e 16%, respectivamente. Por outro lado, esta frequência alélica é ligeiramente superior à encontrada no Reino Unido, 45,3% (58), e muito superior à encontrada noutros países como Brasil, 37% (144), Itália, 11% (53, 54) e ex-União Soviética, 4% (52). Um dos países onde verifica-se uma frequência alélica superior à encontrada em Portugal é na Irlanda, onde existe uma frequência de 79% da mutação W402X (149). Neste último caso a elevada frequência deve-se à presença de muitos doentes MPS I homozigóticos para a mutação W402X provenientes de uma população étnica minoritária de origem irlandesa, os “Irish Travellers”, onde a frequência alélica da mutação W402X é muito alta (149).

Com a finalidade de estudar as alterações polimórficas intragénicas e de avaliar a possível existência de um haplótipo comum nos alelos mutados detectados pelas técnicas de PCR-RFLP e PCR-dHPLC, foi feita uma pesquisa de SNPs que normalmente encontram-se associados à mutação W402X. De entre os vários SNPs seleccionados, os SNPs A12 e L118 não

foram encontrados em nenhuns dos portadores identificados. Os SNPs A8, A20 e N297 foram encontrados em dois haplótipos diferentes, e o SNP Q33H foi o único presente em todos os haplótipos encontrados. Em termos gerais, encontraram-se três haplótipos diferentes, sendo o Haplótipo 1 (SNPs A8, A20, Q33H) o mais representativo nesta amostra.

Verificou-se que os haplótipos encontrados eram distintos dos descritos em artigos onde eram mencionadas associações alélicas entre W402X e estes SNPs. Em doentes MPS I brasileiros, os SNPs encontrados eram A8, A20, N297 e Q33H, os mesmos SNPs encontrados nos nossos portadores, mas em associações diferentes (144). Por outro lado, em doentes MPS I italianos apenas foram encontrados os SNPs A8 e A20 (54), em doentes checos foram encontrados os SNPs A8, A20 e N297 (145), e em doentes australianos foram encontrados os SNPs A8, L118, A12 e A20 (146). A variabilidade encontrada em termos de haplótipos parece indicar divergência entre os alelos W402X. Aparentemente o SNP mais frequentemente associado à mutação W402X em portugueses e brasileiros é o Q33H, seria interessante saber se na população irlandesa esta associação também se verifica. O facto de esta mutação surgir com frequência mais elevada em Portugal, Reino Unido, Espanha e Irlanda poderá sugerir a existência de um ancestral comum em populações da Europa Ocidental. Assim, em termos de mutações frequentes em doentes MPS I, parece existir um gradiente decrescente de Leste para Oeste, no caso da mutação Q70X, de Sul para Norte para a mutação P533R, e de Oeste para Leste para a mutação W402X.

Quando sequenciou-se a totalidade do gene *IDUA* de todas as linhas celulares de fibroblastos utilizadas, a fim de confirmar a presença ou ausência do genótipo desejável, apenas foi detectado, no genótipo das linhas celulares de fibroblastos GM00798 e GM00799, a presença do SNP Q33H no exão 1 do gene *IDUA*, em homozigotia e heterozigotia, respectivamente. A presença deste SNP parece estar mais uma vez associada à mutação em estudo, pois as linhas celulares de fibroblastos GM00798 e GM00799 correspondem a filha e mãe, respectivamente.

Para avaliar o efeito da supressão de mutações *nonsense*, várias experiências de terapia de supressão de mutações *nonsense* têm sido realizadas em diferentes tipos de doenças. No caso da fibrose cística, verificou-se que o aminoglicosídeo G418 consegue suprimir algumas mutações *nonsense* (CTP: TGA), uma vez que conseguiu-se detectar proteína CFTR funcional e houve a recuperação da função da proteína CFTR em 90% dos doentes com mutações *nonsense* (130, 131, 133, 137, 138). Na distrofia muscular de Duchenne, também verificou-se que a

gentamicina conseguiu suprimir uma mutação *nonsense* (CTP: TAA), tendo como resultado a recuperação de 20% dos níveis da proteína distrofina (125, 128, 132, 139). No caso da lipofuscinose neuronal infantil, na presença da gentamicina ocorreu a supressão da mutação *nonsense* R208X (CTP: TGA) do gene *CLN2*, que codifica a proteína TPP-1, uma vez que conduziu à detecção de mais de 7% dos níveis de proteína TPP-1 normal em células tratadas com gentamicina (140). Na cistinose, a gentamicina também suprimiu a mutação *nonsense* W138X (CTP: TGA) do gene *CTNS*, tendo-se restaurado a proteína cistinosina e reduzido o nível de sobrecarga de cistina nos lisossomas (141). No síndrome de Hurler, Keeling *et al.* demonstrou que, numa linha celular de fibroblastos heterozigóticos compostos para as mutações *nonsense* Q70X e W402X do gene *IDUA*, havia um aumento na actividade da α -L-iduronidase na presença da gentamicina, que resultava na recuperação de 2,8% da actividade normal da α -L-iduronidase. Essa recuperação da actividade enzimática conduzia a uma redução da acumulação de GAGs nas células dos doentes para níveis normais, que mantêm-se durante 2 dias após terminar o tratamento com gentamicina (127). Um estudo mais recente mostrou que uma variedade de mutações *nonsense* do gene *IDUA* pode ser suprimida pela gentamicina em células de mamíferos (135). Neste estudo aferiu-se que, o *read-through* dos codões de terminação naturais é dependente da fidelidade do codão de terminação em questão, como verificou-se para as mutações Q70X e W402X (CTPs: TAG) em células CHO-K1, pois os três codões de terminação possíveis TAA, TAG e TGA tinham diferentes efeitos na estabilidade do mRNA. Em células CHO-K1 que expressam as mutações Q70X e W402X, o nível do efeito da gentamicina no *read-through* do codão de terminação (TAG) foi ligeiramente inferior ao incremento da actividade causada por um codão de terminação de menor fidelidade (TAA e TGA). Neste sistema, a gentamicina tinha mais efeito no *read-through* para os codões de terminação TAA e TGA quando comparado com o codão de terminação TAG. No estudo de um doente MPS I, os CTPs TGA foram associados com um fenótipo clínico mais atenuado, quando comparado com o fenótipo clássico do síndrome de Hurler (por exemplo, os genótipos W402X/W402X e Q70X/Q70X com codões de terminação TAG).

A maioria das mutações descritas no gene *GBA* como responsáveis pela doença de Gaucher são mutações *missense*, mas outras mutações *nonsense* e *frameshift* também têm sido descritas. Estas mutações geram CTPs, que provocam a degradação do mRNA através do mecanismo NMD. Num estudo com doentes espanhóis de Gaucher verificou-se que, uma linha celular de um doente que tinha uma mutação *nonsense* R296X (CTP: TGA) em homozigotia,

mostrou uma recuperação parcial da quantidade de mRNA após o tratamento com CHX (500 µg/ml; 8 horas de incubação), tendo um aumento de 1,7% para 18% do valor encontrado para um portador da mutação N370S, que foi usado neste estudo como controlo (124). Noutro estudo examinou-se o papel do NMD, através de uma abordagem diferente, no gene *HEXA* em linfoblastos de um doente de Tay-Sachs homozigótico para a mutação *frameshift* comum 1278ins4. Verificou-se que, após 4 horas de tratamento com 28 µg/ml de CHX, o mRNA mutante que era quase indetectável nestas células (menos de 10%), aumentou para 56% do valor encontrado em linfoblastos normais sem tratamento, ou aproximadamente para 40% do valor encontrado em linfoblastos normais na presença de CHX (123).

Com o objectivo de caracterizar funcionalmente a mutação W402X do gene *IDUA*, avaliou-se a sua susceptibilidade a mecanismos de supressão de *nonsense* com dois compostos distintos, a gentamicina e a cicloheximida (CHX). No que diz respeito ao efeito da gentamicina na supressão da mutação *nonsense* W402X, os resultados obtidos do tratamento com 100 µg/ml de gentamicina permitem-nos aferir que o efeito de supressão da mutação *nonsense* W402X com esta concentração de gentamicina foi inespecífico, uma vez que o aumento de expressão do gene *IDUA* foi idêntico em todas as linhas celulares em estudo. Embora tenha-se verificado um aumento de expressão do gene *IDUA* de 2-3 vezes na linha celular GM00798, não verificou-se o aumento gradual esperado na expressão do gene *IDUA* nas restantes linhas celulares (GM00799 e CT), que tiveram também um aumento de expressão de 2-3 vezes. No caso do tratamento com 600 µg/ml, não verificou-se qualquer aumento na expressão do gene *IDUA* da linha celular GM00798, portanto esta concentração de gentamicina não teve qualquer efeito na supressão da mutação *nonsense* W402X desta linha celular. Nas linhas celulares GM00799 e CT houve um aumento idêntico de 3-4 vezes na expressão do gene *IDUA*, sendo que o esperado era um aumento gradual entre estas linhas celulares (e não este aumento idêntico). Face a resultados tão diferentes encontrados nos tratamentos com 100 e 600 µg/ml de gentamicina, o efeito de supressão da gentamicina na mutação *nonsense* W402X não parece ser o mais eficaz, pois embora no tratamento com 100 µg/ml de gentamicina tenha-se verificado um aumento de expressão do gene *IDUA* de 2-3 vezes na linha celular GM00798, sabe-se que a gentamicina tem um menor efeito de supressão de mutações *nonsense* com codões de terminação TAG (presente na mutação W402X) quando comparado com os outros codões de terminação TAA e TGA (135). Assim, como o codão de terminação normal do gene *IDUA* é TGA e existe um outro codão de

terminação TGA 180 pb depois, a gentamicina pode também estar a suprimir estes codões de terminação.

Por outro lado, no que diz respeito ao efeito da CHX na supressão da mutação W402X, os resultados obtidos do tratamento com 100 µg/ml de CHX permitem constatar que, como existe um aumento gradual na expressão do gene *IDUA* nas diferentes linhas celulares, ou seja, um aumento de expressão de 2-3 vezes na linha celular GM00798, um aumento de expressão de 3-4 vezes na linha celular GM00799 e um aumento de expressão de 5-6 vezes na linha celular controlo, o efeito de supressão da mutação *nonsense* W402X com esta concentração de CHX foi eficaz. No tratamento com 600 µg/ml de CHX, também verificou-se um aumento gradual de expressão do gene *IDUA*, no entanto, esta concentração de CHX não foi tão eficaz nas linhas celulares GM00799 e controlo. Face aos resultados obtidos nos tratamentos com 100 e 600 µg/ml de CHX, o efeito de supressão da CHX na mutação *nonsense* W402X parece ser muito eficaz, sendo a concentração de 100 µg/ml a concentração com que obteve-se melhores resultados.

De salientar que, o aumento de expressão do gene *IDUA* de 2-3 vezes verificado na linha celular GM00798 que foi tratada com 100 e 600 µg/ml de CHX e 100 µg/ml de gentamicina, fez com que se atingisse, aproximadamente, o valor de expressão encontrado na linha celular controlo sem tratamento. Resta saber se este aumento de expressão do gene *IDUA* reflecte-se no aparecimento de proteína funcional ou não, e nesse sentido terão de ser realizados ensaios de *western blotting* e de actividade enzimática.

Apesar dos resultados obtidos através do tratamento com gentamicina na supressão da mutação *nonsense* W402X do gene *IDUA* não terem sido muito favoráveis, e dos aminoglicosídeos serem uma causa de toxicidade celular, um estudo muito recente (150) demonstrou que um dos novos compostos derivados de aminoglicosídeos, o NB84 conseguiu suprimir com sucesso a mutação equivalente num modelo murino. O composto NB84, que possui uma toxicidade celular reduzida, conseguiu suprimir significativamente a mutação *nonsense* *Idua*-W392X e restaurar os níveis de actividade funcional da α -L-iduronidase, de forma a reverter parcialmente a acumulação anormal de GAGs em fibroblastos derivados de ratinhos *Idua*-W392X. Também verificou-se, *in vivo*, que a administração do composto NB84 a ratinhos *Idua*-W392X conseguiu reduzir significativamente a excreção de GAGs na urina e a acumulação de GAGs nos tecidos. Tendo em conta estes resultados (150), pode-se aferir que a terapia de

supressão de mutações *nonsense* com compostos derivados de aminoglicosídeos tem potencial para atenuar o fenótipo da doença MPS IH.

A sensibilidade à CHX permite realçar que um mecanismo subjacente ao carácter patológico desta mutação é o de NMD. Os resultados obtidos do tratamento com a CHX na supressão da mutação *nonsense* W402X do gene *IDUA* foram muito promissores, podendo adivinhar-se que o desenvolvimento de uma terapia de supressão de CTPs com compostos inibidores do NMD, também pode ser outro potencial caminho para aligeirar o fenótipo dos doentes de MPS IH. E, embora a CHX também tenha propriedades tóxicas, os resultados obtidos com a CHX vieram demonstrar, pela primeira vez, o potencial terapêutico da utilização de outros agentes inibidores do NMD, não aminoglicosídeos, na supressão de mutações *nonsense* causadoras da doença MPS IH.

6. Conclusão e Perspectivas Futuras

O desenvolvimento deste trabalho de mestrado, para além de ter permitido determinar a frequência alélica da mutação W402X do gene *IDUA* na população portuguesa em geral, que é de 0,20% (IC: 0,08-0,39), também permitiu melhorar e desenvolver um método de despistagem para a detecção por dHPLC da mutação W402X e de SNPs em torno desta mutação do gene *IDUA*.

Uma vez que um dos objectivos do trabalho foi estudar as alterações polimórficas intragénicas, de maneira a avaliar a possível existência de um haplótipo comum nos alelos mutados detectados pela técnica de PCR-RFLP e pela técnica de PCR-dHPLC, foi realizada uma pesquisa de SNPs que normalmente encontram-se associados com a mutação W402X. Através desta pesquisa de SNPs, verificou-se a existência de 3 haplótipos diferentes, sendo o Haplótipo 1 (constituído pelos SNPs A8, A20 e Q33H) encontrado em 5 dos 8 portadores da mutação W402X. O SNP Q33H foi o único encontrado em todos os haplótipos, tanto nos portadores da mutação W402X, como no doente em estudo.

Por fim, outro objectivo deste trabalho foi caracterizar funcionalmente a mutação W402X do gene *IDUA*. Comprovou-se, não só, que esta mutação resulta em *nonsense mediated decay*, mas também, que é susceptível a mecanismos de supressão de *nonsense* com dois compostos distintos, a gentamicina e a cicloheximida (CHX). Face aos resultados obtidos nos diferentes tratamentos, o efeito de supressão da CHX na mutação *nonsense* W402X do gene *IDUA* provou ser muito mais eficaz na linha celular de um doente MPS IH homozigótico para a mutação *nonsense* W402X do gene *IDUA*, uma vez que verificou-se um aumento de expressão do gene *IDUA*, que atingiu, aproximadamente, o valor de expressão encontrado na linha celular controlo sem tratamento. No entanto, resta saber se este aumento de expressão do gene *IDUA*, conduz ao aparecimento de uma proteína funcional, e para isso ensaios de *western blotting* e de actividade enzimática devem ser realizados.

Em termos de desenvolvimento de terapias para a supressão da mutação *nonsense* W402X do gene *IDUA*, e face aos resultados obtidos em fibroblastos de um doente MPS IH homozigótico para esta mutação, seria interessante testar e avaliar os efeitos moleculares e bioquímicos do tratamento com CHX no ratinho *Idua*-W392X. Uma vez que, o efeito de supressão da gentamicina na mutação *nonsense* W402X do gene *IDUA* provou não ser tão consistente, seria interessante testar e avaliar o efeito de supressão de outros novos compostos

derivados de aminoglicosídeos, como o composto NB84, na mutação *nonsense* W402X do gene *IDUA* em fibroblastos de um doente MPS IH homozigótico para a mutação W402X.

Deve-se ter sempre presente que todos os desenvolvimentos e conhecimentos que se obtenham em termos de terapia de supressão *nonsense*, podem ser potencialmente úteis quando utilizados em sinergia com as intervenções terapêuticas já existentes. Neste sentido, as lacunas existentes nas terapias actuais poderão ser corrigidas, tornando-se mais específicas e personalizadas, possibilitando melhorar cada vez mais o fenótipo dos doentes de MPS IH.

7. Bibliografia

1. Meikle, P.J., Grasby, D.J., Dean, C.J., Lang, D.L., Bockmann, M., Whittle, A.M., Fietz, M.J., Simonsen, H., Fuller, M., Brooks, D.A. *et al.* (2006) Newborn screening for lysosomal storage disorders. *Mol Genet Metab*, **88**, 307-14.
2. Ballabio, A. and Gieselmann, V. (2009) Lysosomal disorders: from storage to cellular damage. *Biochim Biophys Acta*, **1793**, 684-96.
3. Meikle, P.J., Hopwood, J.J., Clague, A.E. and Carey, W.F. (1999) Prevalence of lysosomal storage disorders. *JAMA*, **281**, 249-54.
4. Opitz, J.M., Stiles, F.C., Wise, D., Race, R.R., Sanger, R., Von Gemmingen, G.R., Kierland, R.R., Cross, E.G. and De Groot, W.P. (1965) The Genetics of Angiokeratoma Corporis Diffusum (Fabry's Disease) and Its Linkage Relations with the Xg Locus. *Am J Hum Genet*, **17**, 325-42.
5. McKusick, V.A. (1972) The Mucopolysaccharidoses. In *Heritable Disorders of Connective Tissue*. 4th ed. C. V. Mosby, St. Louis, pp. 556-574.
6. Sandhoff, K. and Kolter, T. (1997) Biochemistry of glycosphingolipid degradation. *Clin Chim Acta*, **266**, 51-61.
7. Futerman, A.H. and van Meer, G. (2004) The cell biology of lysosomal storage disorders. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **5**, 554-65.
8. Braulke, T. and Bonifacio, J.S. (2009) Sorting of lysosomal proteins. *Biochim Biophys Acta*, **1793**, 605-14.
9. Neufeld, E.F., Muenzer, J. (2001) The mucopolysaccharidoses. In Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S., Valle, D. (ed.), *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. 8th ed. McGraw-Hill, New York, Vol. 2, pp. 3421-52.
10. Cleary, M.A. and Wraith, J.E. (1995) The presenting features of mucopolysaccharidosis type IH (Hurler syndrome). *Acta Paediatr*, **84**, 337-9.
11. Donaldson, M.D., Pennock, C.A., Berry, P.J., Duncan, A.W., Cawdery, J.E. and Leonard, J.V. (1989) Hurler syndrome with cardiomyopathy in infancy. *J Pediatr*, **114**, 430-2.
12. Stephan, M.J., Stevens, E.L., Jr., Wenstrup, R.J., Greenberg, C.R., Gritter, H.L., Hodges, G.F. and Guller, B. (1989) Mucopolysaccharidosis I presenting with endocardial fibroelastosis of infancy. *Am J Dis Child*, **143**, 782-4.
13. Nowaczyk, M.J., Clarke, J.T. and Morin, J.D. (1988) Glaucoma as an early complication of Hurler's disease. *Arch Dis Child*, **63**, 1091-3.
14. Braunlin, E.A., Hunter, D.W., Krivit, W., Burke, B.A., Hesslein, P.S., Porter, P.T. and Whitley, C.B. (1992) Evaluation of coronary artery disease in the Hurler syndrome by angiography. *Am J Cardiol*, **69**, 1487-9.
15. du Cret, R.P., Weinberg, E.J., Jackson, C.A., Braunlin, E.A., Boudreau, R.J., Kuni, C.C., Carpenter, B.M., Hunter, D.W., Krivit, W. and Bodeau, G. (1994) Resting TI-201 scintigraphy in the evaluation of coronary artery disease in children with Hurler syndrome. *Clin Nucl Med*, **19**, 975-8.
16. Grossman, H., Dorst, J.P. (1973) The mucopolysaccharidoses and mucopolipidoses. In Kaufman, H.J. (ed.), *Prog Pediatr Radiol* Vol. 4, p. 495.
17. Sly, W.S. (1980) The mucopolysaccharidoses. In Bondy, P.D., Rosenberg, L.E. (ed.), *Metabolic Control and Disease*. Saunders, Philadelphia, p. 545.
18. Whitley, C.B. (1993) The mucopolysaccharidoses. In Beighton, P. (ed.), *McKusick's Heritable Disorders of Connective Tissue*. 5th ed. CV Mosby, St. Louis, p. 367.
19. Pennock, C.A. (1976) A review and selection of simple laboratory methods used for the study of glycosaminoglycan excretion and the diagnosis of the mucopolysaccharidoses. *J Clin Pathol*, **29**, 111-23.

20. Piraud, M., Boyer, S., Mathieu, M. and Maire, I. (1993) Diagnosis of mucopolysaccharidoses in a clinically selected population by urinary glycosaminoglycan analysis: a study of 2,000 urine samples. *Clin Chim Acta*, **221**, 171-81.
21. Berry, H.K. (1987) Screening for mucopolysaccharide disorders with the Berry spot test. *Clin Biochem*, **20**, 365-71.
22. de Jong, J.G., Hasselman, J.J., van Landeghem, A.A., Vader, H.L. and Wevers, R.A. (1991) The spot test is not a reliable screening procedure for mucopolysaccharidoses. *Clin Chem*, **37**, 572-5.
23. Chamoles, N.A., Blanco, M. and Gaggioli, D. (2001) Diagnosis of alpha-L-iduronidase deficiency in dried blood spots on filter paper: the possibility of newborn diagnosis. *Clin Chem*, **47**, 780-1.
24. Whitley, C.B., Draper, K.A., Dutton, C.M., Brown, P.A., Severson, S.L. and France, L.A. (1989) Diagnostic test for mucopolysaccharidosis. II. Rapid quantification of glycosaminoglycan in urine samples collected on a paper matrix. *Clin Chem*, **35**, 2074-81.
25. de Jong, J.G., Heijs, W.M. and Wevers, R.A. (1994) Mucopolysaccharidoses screening: dimethylmethyle blue versus alcian blue. *Ann Clin Biochem*, **31 (Pt 3)**, 267-71.
26. Hall, C.W., Liebaers, I., Di Natale, P. and Neufeld, E.F. (1978) Enzymic diagnosis of the genetic mucopolysaccharide storage disorders. *Methods Enzymol*, **50**, 439-56.
27. Kresse, H., von Figura, K., Klein, U., Glossl, J., Paschke, E. and Pohlmann, R. (1982) Enzymic diagnosis of the genetic mucopolysaccharide storage disorders. *Methods Enzymol*, **83**, 559-72.
28. Neufeld, E.F., Muenzer, J. (1995) The mucopolysaccharidoses. In Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S., Valle, D. (ed.), *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. 7th ed. McGraw-Hill, New York, Vol. 2, p. 2465.
29. Barton, R.W. and Neufeld, E.F. (1971) The Hurler corrective factor. Purification and some properties. *J Biol Chem*, **246**, 7773-9.
30. Rome, L.H., Garvin, A.J. and Neufeld, E.F. (1978) Human kidney alpha-L-iduronidase: purification and characterization. *Arch Biochem Biophys*, **189**, 344-53.
31. Clements, P.R., Brooks, D.A., Saccone, G.T. and Hopwood, J.J. (1985) Human alpha-L-iduronidase. 1. Purification, monoclonal antibody production, native and subunit molecular mass. *Eur J Biochem*, **152**, 21-8.
32. Schuchman, E.H., Guzman, N.A. and Desnick, R.J. (1984) Human alpha-L-iduronidase. I. Purification and properties of the high uptake (higher molecular weight) and the low uptake (processed) forms. *J Biol Chem*, **259**, 3132-40.
33. Schuchman, E.H., Guzman, N.A., Takada, G. and Desnick, R.J. (1984) Human alpha-L-iduronidase. II. Comparative biochemical and immunologic properties of the purified low and high uptake forms. *Enzyme*, **31**, 166-75.
34. Ohshita, T., Sakuda, H., Nakasone, S. and Iwamasa, T. (1989) Purification, characterization and subcellular localization of pig liver alpha-L-iduronidase. *Eur J Biochem*, **179**, 201-7.
35. Stoltzfus, L.J., Sosa-Pineda, B., Moskowitz, S.M., Menon, K.P., Dlott, B., Hooper, L., Teplow, D.B., Shull, R.M. and Neufeld, E.F. (1992) Cloning and characterization of cDNA encoding canine alpha-L-iduronidase. mRNA deficiency in mucopolysaccharidosis I dog. *J Biol Chem*, **267**, 6570-5.
36. Scott, H.S., Anson, D.S., Orsborn, A.M., Nelson, P.V., Clements, P.R., Morris, C.P. and Hopwood, J.J. (1991) Human alpha-L-iduronidase: cDNA isolation and expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 9695-9.
37. Clarke, L.A., Nasir, J., Zhang, H., McDonald, H., Applegarth, D.A., Hayden, M.R. and Toone, J. (1994) Murine alpha-L-iduronidase: cDNA isolation and expression. *Genomics*, **24**, 311-6.

38. Myerowitz, R. and Neufeld, E.F. (1981) Maturation of alpha-L-iduronidase in cultured human fibroblasts. *J Biol Chem*, **256**, 3044-8.
39. Taylor, J.A., Gibson, G.J., Brooks, D.A. and Hopwood, J.J. (1991) alpha-L-iduronidase in normal and mucopolysaccharidosis-type-I human skin fibroblasts. *Biochem J*, **274 (Pt 1)**, 263-8.
40. Kakkis, E.D., Matynia, A., Jonas, A.J. and Neufeld, E.F. (1994) Overexpression of the human lysosomal enzyme alpha-L-iduronidase in Chinese hamster ovary cells. *Protein Expr Purif*, **5**, 225-32.
41. Unger, E.G., Durrant, J., Anson, D.S. and Hopwood, J.J. (1994) Recombinant alpha-L-iduronidase: characterization of the purified enzyme and correction of mucopolysaccharidosis type I fibroblasts. *Biochem J*, **304 (Pt 1)**, 43-9.
42. Zhao, K.W., Faull, K.F., Kakkis, E.D. and Neufeld, E.F. (1997) Carbohydrate structures of recombinant human alpha-L-iduronidase secreted by Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem*, **272**, 22758-65.
43. Durand, P., Lehn, P., Callebaut, I., Fabrega, S., Henrissat, B. and Mornon, J.P. (1997) Active-site motifs of lysosomal acid hydrolases: invariant features of clan GH-A glycosyl hydrolases deduced from hydrophobic cluster analysis. *Glycobiology*, **7**, 277-84.
44. Rempel, B.P., Clarke, L.A., Withers, S.G. (2005) A homology model for human α -L-iduronidase: Insights into human disease. *Mol Genet Metab*, **85**, 28-37.
45. Scott, H.S., Guo, X.H., Hopwood, J.J. and Morris, C.P. (1992) Structure and sequence of the human alpha-L-iduronidase gene. *Genomics*, **13**, 1311-3.
46. Scott, H.S., Ashton, L.J., Eyre, H.J., Baker, E., Brooks, D.A., Callen, D.F., Sutherland, G.R., Morris, C.P. and Hopwood, J.J. (1990) Chromosomal localization of the human alpha-L-iduronidase gene (IDUA) to 4p16.3. *Am J Hum Genet*, **47**, 802-7.
47. MacDonald, M.E., Scott, H.S., Whaley, W.L., Pohl, T., Wasmuth, J.J., Lehrach, H., Morris, C.P., Frischauf, A.M., Hopwood, J.J. and Gusella, J.F. (1991) Huntington disease-linked locus D4S111 exposed as the alpha-L-iduronidase gene. *Somat Cell Mol Genet*, **17**, 421-5.
48. Scott, H.S., Litjens, T., Hopwood, J.J. and Morris, C.P. (1992) A common mutation for mucopolysaccharidosis type I associated with a severe Hurler syndrome phenotype. *Hum Mutat*, **1**, 103-8.
49. Scott, H.S., Litjens, T., Nelson, P.V., Brooks, D.A., Hopwood, J.J. and Morris, C.P. (1992) alpha-L-iduronidase mutations (Q70X and P533R) associate with a severe Hurler phenotype. *Hum Mutat*, **1**, 333-9.
50. Bunge, S., Kleijer, W.J., Steglich, C., Beck, M., Zuther, C., Morris, C.P., Schwinger, E., Hopwood, J.J., Scott, H.S. and Gal, A. (1994) Mucopolysaccharidosis type I: identification of 8 novel mutations and determination of the frequency of the two common alpha-L-iduronidase mutations (W402X and Q70X) among European patients. *Hum Mol Genet*, **3**, 861-6.
51. Gort, L., Chabas, A. and Coll, M.J. (1998) Analysis of five mutations in 20 mucopolysaccharidosis type 1 patients: high prevalence of the W402X mutation. Mutations in brief no. 121. Online. *Hum Mutat*, **11**, 332-3.
52. Voskoboeva, E.Y., Krasnopolskaya, X.D., Mirenburg, T.V., Weber, B. and Hopwood, J.J. (1998) Molecular genetics of mucopolysaccharidosis type I: mutation analysis among the patients of the former Soviet Union. *Mol Genet Metab*, **65**, 174-80.
53. Gatti, R., DiNatale, P., Villani, G.R., Filocamo, M., Muller, V., Guo, X.H., Nelson, P.V., Scott, H.S. and Hopwood, J.J. (1997) Mutations among Italian mucopolysaccharidosis type I patients. *J Inher Metab Dis*, **20**, 803-6.
54. Venturi, N., Rovelli, A., Parini, R., Menni, F., Brambillasca, F., Bertagnolio, F., Uziel, G., Gatti, R., Filocamo, M., Donati, M.A. et al. (2002) Molecular analysis of 30 mucopolysaccharidosis type I patients: evaluation of the mutational spectrum in Italian population and identification of 13 novel mutations. *Hum Mutat*, **20**, 231.

55. Alif, N., Hess, K., Straczek, J., Sebbar, S., N'Bou, A., Nabet, P. and Dousset, B. (1999) Mucopolysaccharidosis type I: characterization of a common mutation that causes Hurler syndrome in Moroccan subjects. *Ann Hum Genet*, **63**, 9-16.
56. Bach, G., Moskowitz, S.M., Tieu, P.T., Matynia, A. and Neufeld, E.F. (1993) Molecular analysis of Hurler syndrome in Druze and Muslim Arab patients in Israel: multiple allelic mutations of the IDUA gene in a small geographic area. *Am J Hum Genet*, **53**, 330-8.
57. Yamagishi, A., Tomatsu, S., Fukuda, S., Uchiyama, A., Shimozawa, N., Suzuki, Y., Kondo, N., Sukegawa, K. and Orii, T. (1996) Mucopolysaccharidosis type I: identification of common mutations that cause Hurler and Scheie syndromes in Japanese populations. *Hum Mutat*, **7**, 23-9.
58. Beesley, C.E., Meaney, C.A., Greenland, G., Adams, V., Vellodi, A., Young, E.P. and Winchester, B.G. (2001) Mutational analysis of 85 mucopolysaccharidosis type I families: frequency of known mutations, identification of 17 novel mutations and in vitro expression of missense mutations. *Hum Genet*, **109**, 503-11.
59. Clarke, L.A., Nelson, P.V., Warrington, C.L., Morris, C.P., Hopwood, J.J. and Scott, H.S. (1994) Mutation analysis of 19 North American mucopolysaccharidosis type I patients: identification of two additional frequent mutations. *Hum Mutat*, **3**, 275-82.
60. Scott, H.S., Bunge, S., Gal, A., Clarke, L.A., Morris, C.P. and Hopwood, J.J. (1995) Molecular genetics of mucopolysaccharidosis type I: diagnostic, clinical, and biological implications. *Hum Mutat*, **6**, 288-302.
61. Matte, U., Leistner, S., Lima, L., Schwartz, I. and Giugliani, R. (2000) Unique frequency of known mutations in Brazilian MPS I patients. *Am J Med Genet*, **90**, 108-9.
62. Pinto, E., Ribeiro, I., Amaral, O. and Sá Miranda, M.C. (2001) Mutation analysis of Portuguese Hurler patients. *13th ESGLD Workshop*, 92.
63. Pinto, R., Caseiro, C., Lemos, M., Lopes, L., Fontes, A., Ribeiro, H., Pinto, E., Silva, E., Rocha, S., Marcao, A. *et al.* (2004) Prevalence of lysosomal storage diseases in Portugal. *Eur J Hum Genet*, **12**, 87-92.
64. Oefner, P.J., Underhill, P.A. (1995) Comparative DNA sequencing by denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC). *Am J Hum Genet*, **57**, A226.
65. Oefner, P.J., Underhill, P.A. (1998) Detection of nucleic acid heteroduplex molecules by denaturing high-performance liquid chromatography and methods for comparative sequencing. *US Patent*, **5**, 795,976.
66. Oefner, P.J., Underhill, P.A. (1999) DNA mutation detection using denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC). In Dracopoli, N.C., Haines, J., Korf, B.R., Morton, C., Seidman, C.E., Seidman, J.G., Moir, D.T., Smith, D.R. (ed.), *Current protocols in human genetics*. Wiley-Interscience, New York, Vol. 19, pp. 7.10.1-7.10.12.
67. Underhill, P.A., Jin, L., Lin, A.A., Mehdi, S.Q., Jenkins, T., Vollrath, D., Davis, R.W., Cavalli-Sforza, L.L. and Oefner, P.J. (1997) Detection of numerous Y chromosome biallelic polymorphisms by denaturing high-performance liquid chromatography. *Genome Res*, **7**, 996-1005.
68. Xiao, W. and Oefner, P.J. (2001) Denaturing high-performance liquid chromatography: A review. *Hum Mutat*, **17**, 439-74.
69. Millat, G., Bailo, N., Molinero, S., Rodriguez, C., Chikh, K. and Vanier, M.T. (2005) Niemann-Pick C disease: use of denaturing high performance liquid chromatography for the detection of NPC1 and NPC2 genetic variations and impact on management of patients and families. *Mol Genet Metab*, **86**, 220-32.
70. Pomponio, R.J., Cabrera-Salazar, M.A., Echeverri, O.Y., Miller, G. and Barrera, L.A. (2005) Gaucher disease in Colombia: mutation identification and comparison to other Hispanic populations. *Mol Genet Metab*, **86**, 466-72.

71. Shabbeer, J., Robinson, M. and Desnick, R.J. (2005) Detection of alpha-galactosidase a mutations causing Fabry disease by denaturing high performance liquid chromatography. *Hum Mutat*, **25**, 299-305.
72. Kasper, D.C., Iqbal, F., Dvorakova, L., Zeman, J., Magner, M., Bodamer, O., Pollak, A., Herkner, K.R. and Item, C.B. (2010) Rapid and accurate denaturing high performance liquid chromatography protocol for the detection of alpha-L-iduronidase mutations causing mucopolysaccharidosis type I. *Clin Chim Acta*, **411**, 345-50.
73. He, X., Li, C.M., Simonaro, C.M., Wan, Q., Haskins, M.E., Desnick, R.J. and Schuchman, E.H. (1999) Identification and characterization of the molecular lesion causing mucopolysaccharidosis type I in cats. *Mol Genet Metab*, **67**, 106-12.
74. Haskins, M.E., Jezyk, P.F., Desnick, R.J., McDonough, S.K. and Patterson, D.F. (1979) Alpha-L-iduronidase deficiency in a cat: a model of mucopolysaccharidosis I. *Pediatr Res*, **13**, 1294-7.
75. Spellacy, E., Shull, R.M., Constantopoulos, G. and Neufeld, E.F. (1983) A canine model of human alpha-L-iduronidase deficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **80**, 6091-5.
76. Shull, R.M., Munger, R.J., Spellacy, E., Hall, C.W., Constantopoulos, G. and Neufeld, E.F. (1982) Canine alpha-L-iduronidase deficiency. A model of mucopolysaccharidosis I. *Am J Pathol*, **109**, 244-8.
77. Menon, K.P., Tieu, P.T. and Neufeld, E.F. (1992) Architecture of the canine IDUA gene and mutation underlying canine mucopolysaccharidosis I. *Genomics*, **14**, 763-8.
78. Ohmi, K., Greenberg, D.S., Rajavel, K.S., Ryazantsev, S., Li, H.H. and Neufeld, E.F. (2003) Activated microglia in cortex of mouse models of mucopolysaccharidoses I and IIIB. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 1902-7.
79. Clarke, L.A., Russell, C.S., Pownall, S., Warrington, C.L., Borowski, A., Dimmick, J.E., Toone, J. and Jirik, F.R. (1997) Murine mucopolysaccharidosis type I: targeted disruption of the murine alpha-L-iduronidase gene. *Hum Mol Genet*, **6**, 503-11.
80. Zheng, Y., Rozengurt, N., Ryazantsev, S., Kohn, D.B., Satake, N. and Neufeld, E.F. (2003) Treatment of the mouse model of mucopolysaccharidosis I with retrovirally transduced bone marrow. *Mol Genet Metab*, **79**, 233-44.
81. Shull, R.M., Helman, R.G., Spellacy, E., Constantopoulos, G., Munger, R.J. and Neufeld, E.F. (1984) Morphologic and biochemical studies of canine mucopolysaccharidosis I. *Am J Pathol*, **114**, 487-95.
82. Garcia-Rivera, M.F., Colvin-Wanshura, L.E., Nelson, M.S., Nan, Z., Khan, S.A., Rogers, T.B., Maitra, I., Low, W.C. and Gupta, P. (2007) Characterization of an immunodeficient mouse model of mucopolysaccharidosis type I suitable for preclinical testing of human stem cell and gene therapy. *Brain Res Bull*, **74**, 429-38.
83. Hartung, S.D., Frandsen, J.L., Pan, D., Koniar, B.L., Graupman, P., Gunther, R., Low, W.C., Whitley, C.B. and McIvor, R.S. (2004) Correction of metabolic, craniofacial, and neurologic abnormalities in MPS I mice treated at birth with adeno-associated virus vector transducing the human alpha-L-iduronidase gene. *Mol Ther*, **9**, 866-75.
84. Russell, C., Henderson, G., Jevon, G., Matlock, T., Yu, J., Aklujkar, M., Ng, K.Y. and Clarke, L.A. (1998) Murine MPS I: insights into the pathogenesis of Hurler syndrome. *Clin Genet*, **53**, 349-61.
85. Desmaris, N., Verot, L., Puech, J.P., Caillaud, C., Vanier, M.T. and Heard, J.M. (2004) Prevention of neuropathology in the mouse model of Hurler syndrome. *Ann Neurol*, **56**, 68-76.
86. Graupman, P., Pan, D., Konair, B., Hartung, S., McIvor, S., Whitley, C., Low, W. and Lam, C.H. (2004) Craniofacial abnormalities in a murine knock-out model of mucopolysaccharidosis I H: a computed tomography and anatomic study. *J Craniofac Surg*, **15**, 392-8.
87. Liu, Y., Xu, L., Hennig, A.K., Kovacs, A., Fu, A., Chung, S., Lee, D., Wang, B., Herati, R.S., Mosinger Ogilvie, J. et al. (2005) Liver-directed neonatal gene therapy prevents

- cardiac, bone, ear, and eye disease in mucopolysaccharidosis I mice. *Mol Ther*, **11**, 35-47.
88. Pan, D., Sciascia, A., 2nd, Vorhees, C.V. and Williams, M.T. (2008) Progression of multiple behavioral deficits with various ages of onset in a murine model of Hurler syndrome. *Brain Res*, **1188**, 241-53.
 89. Reolon, G.K., Braga, L.M., Camassola, M., Luft, T., Henriques, J.A., Nardi, N.B. and Roesler, R. (2006) Long-term memory for aversive training is impaired in *Idua*(-/-) mice, a genetic model of mucopolysaccharidosis type I. *Brain Res*, **1076**, 225-30.
 90. Braunlin, E., Mackey-Bojack, S., Panoskaltis-Mortari, A., Berry, J.M., McElmurry, R.T., Riddle, M., Sun, L.Y., Clarke, L.A., Tolar, J. and Blazar, B.R. (2006) Cardiac functional and histopathologic findings in humans and mice with mucopolysaccharidosis type I: implications for assessment of therapeutic interventions in hurler syndrome. *Pediatr Res*, **59**, 27-32.
 91. Jordan, M.C., Zheng, Y., Ryazantsev, S., Rozengurt, N., Roos, K.P. and Neufeld, E.F. (2005) Cardiac manifestations in the mouse model of mucopolysaccharidosis I. *Mol Genet Metab*, **86**, 233-43.
 92. Kakkis, E.D., McEntee, M.F., Schmidtchen, A., Neufeld, E.F., Ward, D.A., Gompf, R.E., Kania, S., Bedolla, C., Chien, S.L. and Shull, R.M. (1996) Long-term and high-dose trials of enzyme replacement therapy in the canine model of mucopolysaccharidosis I. *Biochem Mol Med*, **58**, 156-67.
 93. Wang, D., Shukla, C., Liu, X., Schoeb, T.R., Clarke, L.A., Bedwell, D.M. and Keeling, K.M. (2010) Characterization of an MPS I-H knock-in mouse that carries a nonsense mutation analogous to the human *IDUA*-W402X mutation. *Mol Genet Metab*, **99**, 62-71.
 94. Baudhuin, P., Hers, H.G. and Loeb, H. (1964) An Electron Microscopic and Biochemical Study of Type II Glycogenosis. *Lab Invest*, **13**, 1139-52.
 95. Fratantoni, J.C., Hall, C.W. and Neufeld, E.F. (1969) The defect in Hurler and Hunter syndromes. II. Deficiency of specific factors involved in mucopolysaccharide degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **64**, 360-6.
 96. Neufeld, E.F. (1979) Lessons from genetic disorders of lysosomes. *Harvey Lect*, **75**, 41-60.
 97. Kaplan, A., Achord, D.T. and Sly, W.S. (1977) Phosphohexosyl components of a lysosomal enzyme are recognized by pinocytosis receptors on human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **74**, 2026-30.
 98. Shull, R.M., Kakkis, E.D., McEntee, M.F., Kania, S.A., Jonas, A.J. and Neufeld, E.F. (1994) Enzyme replacement in a canine model of Hurler syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 12937-41.
 99. Kakkis, E., Muenzer, J., Tiller, G., Waber, L., Belmont, J., Passage, M., Izykowski, B., et al. (1998) Recombinant alpha-L-iduronidase replacement therapy in mucopolysaccharidosis I: Results of a human clinical trial. *Am J Hum Genet*, **63**, A25.
 100. Hobbs, J.R., Hugh-Jones, K., Barrett, A.J., Byrom, N., Chambers, D., Henry, K., James, D.C., Lucas, C.F., Rogers, T.R., Benson, P.F. et al. (1981) Reversal of clinical features of Hurler's disease and biochemical improvement after treatment by bone-marrow transplantation. *Lancet*, **2**, 709-12.
 101. Guffon, N., Souillet, G., Maire, I., Straczek, J. and Guibaud, P. (1998) Follow-up of nine patients with Hurler syndrome after bone marrow transplantation. *J Pediatr*, **133**, 119-25.
 102. Malone, B.N., Whitley, C.B., Duvall, A.J., Belani, K., Sibley, R.K., Ramsay, N.K., Kersey, J.H., Krivit, W. and Berlinger, N.T. (1988) Resolution of obstructive sleep apnea in Hurler syndrome after bone marrow transplantation. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*, **15**, 23-31.

103. Christiansen, S.P., Smith, T.J. and Henslee-Downey, P.J. (1990) Normal intraocular pressure after a bone marrow transplant in glaucoma associated with mucopolysaccharidosis type I-H. *Am J Ophthalmol*, **109**, 230-1.
104. Vinallonga, X., Sanz, N., Balaguer, A., Miro, L., Ortega, J.J. and Casaldaliga, J. (1992) Hypertrophic cardiomyopathy in mucopolysaccharidoses: regression after bone marrow transplantation. *Pediatr Cardiol*, **13**, 107-9.
105. Gatzoulis, M.A., Vellodi, A. and Redington, A.N. (1995) Cardiac involvement in mucopolysaccharidoses: effects of allogeneic bone marrow transplantation. *Arch Dis Child*, **73**, 259-60.
106. Papsin, B.C., Vellodi, A., Bailey, C.M., Ratcliffe, P.C. and Leighton, S.E. (1998) Otologic and laryngologic manifestations of mucopolysaccharidoses after bone marrow transplantation. *Otolaryngol Head Neck Surg*, **118**, 30-6.
107. Tandon, V., Williamson, J.B., Cowie, R.A. and Wraith, J.E. (1996) Spinal problems in mucopolysaccharidosis I (Hurler syndrome). *J Bone Joint Surg Br*, **78**, 938-44.
108. Field, R.E., Buchanan, J.A., Copplemans, M.G. and Aichroth, P.M. (1994) Bone-marrow transplantation in Hurler's syndrome. Effect on skeletal development. *J Bone Joint Surg Br*, **76**, 975-81.
109. Masterson, E.L., Murphy, P.G., O'Meara, A., Moore, D.P., Dowling, F.E. and Fogarty, E.E. (1996) Hip dysplasia in Hurler's syndrome: orthopaedic management after bone marrow transplantation. *J Pediatr Orthop*, **16**, 731-3.
110. Gullingsrud, E.O., Krivit, W. and Summers, C.G. (1998) Ocular abnormalities in the mucopolysaccharidoses after bone marrow transplantation. Longer follow-up. *Ophthalmology*, **105**, 1099-105.
111. Peters, C., Balthazor, M., Shapiro, E.G., King, R.J., Kollman, C., Hegland, J.D., Henslee-Downey, J., Trigg, M.E., Cowan, M.J., Sanders, J. *et al.* (1996) Outcome of unrelated donor bone marrow transplantation in 40 children with Hurler syndrome. *Blood*, **87**, 4894-902.
112. Peters, C., Shapiro, E.G., Anderson, J., Henslee-Downey, P.J., Klemperer, M.R., Cowan, M.J., Saunders, E.F., deAlarcon, P.A., Twist, C., Nachman, J.B. *et al.* (1998) Hurler syndrome: II. Outcome of HLA-genotypically identical sibling and HLA-haploidentical related donor bone marrow transplantation in fifty-four children. The Storage Disease Collaborative Study Group. *Blood*, **91**, 2601-8.
113. Peters, C., Shapiro, E.G. and Krivit, W. (1998) Hurler syndrome: past, present, and future. *J Pediatr*, **133**, 7-9.
114. Anson, D.S., Bielicki, J. and Hopwood, J.J. (1992) Correction of mucopolysaccharidosis type I fibroblasts by retroviral-mediated transfer of the human alpha-L-iduronidase gene. *Hum Gene Ther*, **3**, 371-9.
115. Fairbairn, L.J., Lashford, L.S., Spooncer, E., McDermott, R.H., Lebens, G., Arrand, J.E., Arrand, J.R., Bellantuono, I., Holt, R., Hatton, C.E. *et al.* (1996) Long-term in vitro correction of alpha-L-iduronidase deficiency (Hurler syndrome) in human bone marrow. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 2025-30.
116. Huang, M.M., Wong, A., Yu, X., Kakkis, E. and Kohn, D.B. (1997) Retrovirus-mediated transfer of the human alpha-L-iduronidase cDNA into human hematopoietic progenitor cells leads to correction in trans of Hurler fibroblasts. *Gene Ther*, **4**, 1150-9.
117. Salvetti, A., Moullier, P., Cornet, V., Brooks, D., Hopwood, J.J., Danos, O. and Heard, J.M. (1995) In vivo delivery of human alpha-L-iduronidase in mice implanted with neo-organs. *Hum Gene Ther*, **6**, 1153-9.
118. Verma, I.M. and Somia, N. (1997) Gene therapy -- promises, problems and prospects. *Nature*, **389**, 239-42.
119. Maquat, L.E. (2004) Nonsense-mediated mRNA decay: splicing, translation and mRNP dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **5**, 89-99.

120. Holbrook, J.A., Neu-Yilik, G., Hentze, M.W. and Kulozik, A.E. (2004) Nonsense-mediated decay approaches the clinic. *Nat Genet*, **36**, 801-8.
121. Mendell, J.T., Sharifi, N.A., Meyers, J.L., Martinez-Murillo, F. and Dietz, H.C. (2004) Nonsense surveillance regulates expression of diverse classes of mammalian transcripts and mutes genomic noise. *Nat Genet*, **36**, 1073-8.
122. Carter, M.S., Daskow, J., Morris, P., Li, S., Nhim, R.P., Sandstedt, S. and Wilkinson, M.F. (1995) A regulatory mechanism that detects premature nonsense codons in T-cell receptor transcripts in vivo is reversed by protein synthesis inhibitors in vitro. *J Biol Chem*, **270**, 28995-9003.
123. Rajavel, K.S. and Neufeld, E.F. (2001) Nonsense-mediated decay of human HEXA mRNA. *Mol Cell Biol*, **21**, 5512-9.
124. Montfort, M., Chabas, A., Vilageliu, L. and Grinberg, D. (2006) Analysis of nonsense-mediated mRNA decay in mutant alleles identified in Spanish Gaucher disease patients. *Blood Cells Mol Dis*, **36**, 46-52.
125. Manuvakhova, M., Keeling, K. and Bedwell, D.M. (2000) Aminoglycoside antibiotics mediate context-dependent suppression of termination codons in a mammalian translation system. *RNA*, **6**, 1044-55.
126. Lynch, S.R. and Puglisi, J.D. (2001) Structural origins of aminoglycoside specificity for prokaryotic ribosomes. *J Mol Biol*, **306**, 1037-58.
127. Keeling, K.M., Brooks, D.A., Hopwood, J.J., Li, P., Thompson, J.N. and Bedwell, D.M. (2001) Gentamicin-mediated suppression of Hurler syndrome stop mutations restores a low level of alpha-L-iduronidase activity and reduces lysosomal glycosaminoglycan accumulation. *Hum Mol Genet*, **10**, 291-9.
128. Howard, M.T., Shirts, B.H., Petros, L.M., Flanigan, K.M., Gesteland, R.F. and Atkins, J.F. (2000) Sequence specificity of aminoglycoside-induced stop codon readthrough: potential implications for treatment of Duchenne muscular dystrophy. *Ann Neurol*, **48**, 164-9.
129. Keeling, K.M. and Bedwell, D.M. (2002) Clinically relevant aminoglycosides can suppress disease-associated premature stop mutations in the IDUA and P53 cDNAs in a mammalian translation system. *J Mol Med (Berl)*, **80**, 367-76.
130. Howard, M., Frizzell, R.A. and Bedwell, D.M. (1996) Aminoglycoside antibiotics restore CFTR function by overcoming premature stop mutations. *Nat Med*, **2**, 467-9.
131. Bedwell, D.M., Kaenjak, A., Benos, D.J., Bebok, Z., Bubien, J.K., Hong, J., Tousson, A., Clancy, J.P. and Sorscher, E.J. (1997) Suppression of a CFTR premature stop mutation in a bronchial epithelial cell line. *Nat Med*, **3**, 1280-4.
132. Barton-Davis, E.R., Cordier, L., Shoturma, D.I., Leland, S.E. and Sweeney, H.L. (1999) Aminoglycoside antibiotics restore dystrophin function to skeletal muscles of mdx mice. *J Clin Invest*, **104**, 375-81.
133. Wilschanski, M., Yahav, Y., Yaacov, Y., Blau, H., Bentur, L., Rivlin, J., Aviram, M., Bdolah-Abram, T., Bebok, Z., Shushi, L. *et al.* (2003) Gentamicin-induced correction of CFTR function in patients with cystic fibrosis and CFTR stop mutations. *N Engl J Med*, **349**, 1433-1441.
134. Clancy, J.P., Bebok, Z., Ruiz, F., King, C., Jones, J., Walker, L., Greer, H., Hong, J., Wing, L., Macaluso, M. *et al.* (2001) Evidence that systemic gentamicin suppresses premature stop mutations in patients with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*, **163**, 1683-92.
135. Hein, L.K., Bawden, M., Muller, V.J., Sillence, D., Hopwood, J.J. and Brooks, D.A. (2004) alpha-L-iduronidase premature stop codons and potential read-through in mucopolysaccharidosis type I patients. *J Mol Biol*, **338**, 453-62.
136. Strausbaugh, L.J. and Brinker, G.S. (1983) Effect of osmotic blood-brain barrier disruption on gentamicin penetration into the cerebrospinal fluid and brains of normal rabbits. *Antimicrob Agents Chemother*, **24**, 147-50.

137. Zsembery, A., Jessner, W., Sitter, G., Spirli, C., Strazzabosco, M. and Graf, J. (2002) Correction of CFTR malfunction and stimulation of Ca-activated Cl channels restore HCO₃⁻ secretion in cystic fibrosis bile ductular cells. *Hepatology*, **35**, 95-104.
138. Du, M., Jones, J.R., Lanier, J., Keeling, K.M., Lindsey, J.R., Tousson, A., Bebok, Z., Whitsett, J.A., Dey, C.R., Colledge, W.H. *et al.* (2002) Aminoglycoside suppression of a premature stop mutation in a Cftr^{-/-} mouse carrying a human CFTR-G542X transgene. *J Mol Med (Berl)*, **80**, 595-604.
139. Loufrani, L., Dubroca, C., You, D., Li, Z., Levy, B., Paulin, D. and Henrion, D. (2004) Absence of dystrophin in mice reduces NO-dependent vascular function and vascular density: total recovery after a treatment with the aminoglycoside gentamicin. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **24**, 671-6.
140. Sleat, D.E., Sohar, I., Gin, R.M. and Lobel, P. (2001) Aminoglycoside-mediated suppression of nonsense mutations in late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis. *Eur J Paediatr Neurol*, **5 Suppl A**, 57-62.
141. Helip-Wooley, A., Park, M.A., Lemons, R.M. and Thoene, J.G. (2002) Expression of CTNS alleles: subcellular localization and aminoglycoside correction in vitro. *Mol Genet Metab*, **75**, 128-33.
142. Sossi, V., Giuli, A., Vitali, T., Tiziano, F., Mirabella, M., Antonelli, A., Neri, G. and Brahe, C. (2001) Premature termination mutations in exon 3 of the SMN1 gene are associated with exon skipping and a relatively mild SMA phenotype. *Eur J Hum Genet*, **9**, 113-20.
143. Keeling, K.M., Bedwell, D.M. (2005) Pharmacological Suppression of Premature Stop Mutations that Cause Genetic Diseases. *Current Pharmacogenomics*, **3**, 1-11.
144. Matte, U., Yogalingam, G., Brooks, D., Leistner, S., Schwartz, I., Lima, L., Norato, D.Y., Brum, J.M., Beesley, C., Winchester, B. *et al.* (2003) Identification and characterization of 13 new mutations in mucopolysaccharidosis type I patients. *Mol Genet Metab*, **78**, 37-43.
145. Vazna, A., Beesley, C., Berna, L., Stolnaja, L., Myskova, H., Bouckova, M., Vlaskova, H., Poupetova, H., Zeman, J., Magner, M. *et al.* (2009) Mucopolysaccharidosis type I in 21 Czech and Slovak patients: mutation analysis suggests a functional importance of C-terminus of the IDUA protein. *Am J Med Genet A*, **149A**, 965-74.
146. Yogalingam, G., Guo, X.H., Muller, V.J., Brooks, D.A., Clements, P.R., Kakkis, E.D. and Hopwood, J.J. (2004) Identification and molecular characterization of alpha-L-iduronidase mutations present in mucopolysaccharidosis type I patients undergoing enzyme replacement therapy. *Hum Mutat*, **24**, 199-207.
147. Wilson, E.B. (1927) Probable Inference, the Law of Succession, and Statistica Inference. *J Am Stat Assoc*, **22**, 209-212.
148. Miettinen, O. and Nurminen, M. (1985) Comparative analysis of two rates. *Stat Med*, **4**, 213-26.
149. Murphy, A.M., Lambert, D., Treacy, E.P., O'Meara, A. and Lynch, S.A. (2009) Incidence and prevalence of mucopolysaccharidosis type 1 in the Irish republic. *Arch Dis Child*, **94**, 52-4.
150. Wang, D., Belakhov, V., Kandasamy, J., Baasov, T., Li, S., Li, Y., Bedwell, D.M. and Keeling, K.M. (2012) The designer aminoglycoside NB84 significantly reduces glycosaminoglycan accumulation associated with MPS I-H in the Idua-W392X mouse. *Mol Genet Metab*, **105**, 116-125.