

## Reclasificación de variante de significancia clínica incierta en un caso de MPS tipo IV-A no clásica

[Reclassification of a variant of uncertain clinical significance in a case of non-classic MPS type IV-A]

Richar José Goméz De la Rosa<sup>1,2</sup> Lina Moreno<sup>1,2</sup>

1) Universidad Libre Seccional, Cali, Colombia; 2) Grupo de investigación en Pediatría GRINPED, Cali, Colombia.

Correspondencia: Richar José Goméz De la Rosa / Email: rigode1808@gmail.com

**Recibido:** 28 de agosto de 2022

**Aceptado:** 20 de febrero de 2023

**Publicado:** 30 de abril de 2023

**Palabras clave:** Enfermedad de Morquio, mucopolisacaridosis, enfermedades lisosomales, variantes genéticas.

**Keywords:** Morquio disease, mucopolysaccharidoses, lysosomal diseases, genetic variants.

**Aspectos bioéticos:** Los autores declaran no tener conflictos de interés asociados a este manuscrito y obtención de consentimiento informado de los pacientes. Este trabajo fue aprobación del comité de ética de la Universidad Libre Seccional Cali – Colombia.

**Financiamiento:** Los autores declaran no haber recibido financiamiento externo asociado a este trabajo.

**Reproducción:** Artículo de acceso libre para uso personal e individual. Sujeto a derechos de reproducción.

**DOI:** 10.37980/im.journal.rsp.20231942

### Resumen

**Introducción:** La mucopolisacardiosis tipo IV - A (MPS IV-A, Síndrome de Morquio tipo A) es un trastorno hereditario autosómico recesivo y una de las enfermedades lisosómicas comunes, causada por el déficit en la actividad de la hidrolasa lisosómica, N-acetylglucosamina-6-sulfatasa (GALNS) lo cual conlleva a una acumulación de glucosaminoglucanos (GAG) como queratán sulfato (KS) y chondroitin-6-sulfato (C6S) en múltiples tejidos. Como en las otras MPS, existen distintos fenotipos, que varían desde formas graves también denominada MPS IV-A clásica hasta formas leves llamada MPS IV-A atenuada o no clásica. **Material y métodos:** Reporte de caso clínico. Los análisis realizados en aislamientos leucocitarios se realizaron por sedimentación usando Dextran-Heparina, liberando la enzima por sonicación y ajustando la concentración proteica, la valoración enzimática se realizó mediante un ensayo fluorométrico, el análisis de secuencia de los genes de interés se realizó mediante secuenciación de nueva generación (NGS) y el análisis in silico se realizó con herramientas de bioinformáticas para predicción del efecto biológico de la variante. **Resultados:** Paciente masculino de 12 años con diagnóstico clínico, paraclinico, enzimático y estudio molecular con dos variantes heterocigóticas, una con clasificación de significancia clínica patogénica y la otra con significancia clínica incierta de MPS IV-A, con posterior reclasificación de significancia de acuerdo con las recomendaciones del Colegio Americano de Genética Médica Y Genómica Y La Asociación de Patología Molecular, y su correlación fenotipo, endotipo y genotipo. **Conclusiones:** La MPS IV-A de manera atenuada representa un reto diagnóstico para profesionales de la salud por lo que es de gran importancia identificar de modo precoz manifestaciones clínicas leves de la enfermedad. A través del uso de herramientas de bioinformática se logró establecer la significancia patogénica de la variante sin sentido c.1088T>C (p. Ile363Thr) y de esta forma se reportarla como variante nueva asociada a MPS IV-A.

### Abstract

**Introduction:** Mucopolysaccharidosis type IV - A (MPS IV-A, Morquio Syndrome type A) is an autosomal recessive hereditary disorder and one of the common lysosomal diseases, caused by a deficiency in the activity of lysosomal hydrolase, N-acetylglucosamine-6-sulfatase (GALNS) which leads to an accumulation of glycosaminoglycans (GAGs) such as keratan sulfate (KS) and chondroitin-6-sulfate (C6S) in multiple tissues. As in the other MPS, there are different phenotypes, ranging from severe forms also called classic MPS IV-A to mild forms called attenuated or non-classic MPS IV-A. **Material and methods:** Clinical case report. The analyzes carried out on leukocyte isolates were carried out by sedimentation using Dextran-Heparin, releasing the enzyme by sonication, and adjusting the protein concentration, the enzymatic assessment was carried out by means of a fluorometric assay, the sequence analysis of the genes of interest was carried out by sequencing of new generation (NGS) and in silico analysis was performed with bioinformatics tools to predict the biological effect of the variant. **Results:** A 12-year-old male patient with a clinical, paraclinical, and enzymatic diagnosis and molecular study with two heterozygous variants, one with a pathogenic clinical significance classification and the other with uncertain clinical significance of MPS IV-A, with subsequent reclassification of significance according to the recommendations of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology, and their phenotype, endotype, and genotype correlation. **Conclusions:** MPS IV-A in an attenuated manner represents a diagnostic challenge for health professionals, which is why it is of great importance to identify mild clinical manifestations of the disease early. With bioinformatics tools, it was possible to establish the pathogenic significance of the nonsense variant c.1088T>C (p. Ile363Thr) and thus report it as a new variant associated with MPS IV-A.

## Introducción

Los errores innatos del metabolismo son enfermedades que individualmente se consideran raras o huérfanas, pero colectivamente son comunes, estos se deben al bloqueo de vías bioquímicas debido a la deficiencia de una enzima, cofactor o transportador [1,2].

Las enfermedades de depósito lisosomal pertenecen al grupo de los errores innatos del metabolismo y entre estas encontramos el grupo de las Mucopolisacaridosis de las cuales se han descrito siete tipos, que como característica habitual tienen la acumulación intracelular de sustancias intermedias del metabolismo de los mucopolisacáridos, también denominados glucosaminoglucanos, secundario a un déficit en la actividad enzimática lisosomal [2,3]. En la MPS IV-A hay compromiso de la hidrolasa lisosómica, N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa, lo cual conlleva a una acumulación de glucosaminoglucanos como queratán sulfato y condroitin-6-sulfato en múltiples tejidos [2].

La MPS IV afecta a hombres y mujeres con igual frecuencia, las estimaciones de prevalencia oscilan entre 1/40.000 y 1/200.000 nacimientos, siendo la MPS IV-A la más frecuentes afectando a 95% de las personas con MPS IV [4]. Autores como Caciotti y cols. (2015) informaron una incidencia poblacional de MPS IV-A de aproximadamente 1 de cada 300.000 nacidos vivos en Italia [5].

En Colombia, los registros concernientes a la frecuencia de las MPS IV-A son escasos, un estudio publicado en el 2012 reportó una frecuencia 0.68 casos por 100.000 nacidos vivos para la MPS IV, sin discriminar la frecuencia de MPS IV A [6]. Por otra parte, Moreno y cols. (2018) hicieron una caracterización clínica y molecular de 12 pacientes con diagnóstico de MPS IV-A, el análisis molecular se realizó mediante el análisis de la secuencia del gen GALNS, las consecuencias de las mutaciones que afectan a las estructuras moleculares de las proteínas y sus impli-

caciones patológicas se determinaron mediante herramientas bioinformáticas. Las muestras se prepararon por dilución a 100 ng/ul y se enviaron a Illumina (San Diego, EE. UU.) para análisis de ADN. En este estudio se informó una variante en el exón 5 c.425A > T p.H142L no descrita anteriormente, para la cual el uso de herramientas de bioinformática y biología computacional logró predecir un efecto deletéreo y generar evidencia para clasificar la variante como patogénica para MPS IV-A [7].

En otro estudio observacional descriptivo, Giraldo y cols, realizaron búsquedas en bases de datos propias de secuenciación completa de exoma de 320 pacientes del sur occidente colombiano sin diagnóstico clínico de MPS. En cuanto a los alelos, el 14% de ellos fueron identificados en el gen GALNS, caracterizado por ser uno de los más estudiados a nivel mundial, y con altas frecuencias mutacionales. En este estudio la variante c.1431G>A fue la más frecuente correspondiendo a 60% de los alelos, seguida en frecuencia por las variantes p.H36= y la variante intrónica 634-19G>A con 41% y 34%, respectivamente. Estos alelos no habían sido reportados en la población afectada por MPS IV-A, por lo que se consideraron variantes benignas [8,9].

Los pacientes con MPS IV-A generalmente no tienen hallazgos clínicos característicos al nacer, la afectación progresiva de huesos y articulaciones conduce a talla baja y finalmente a dolor incapacitante. La participación de otros sistemas de órganos puede provocar morbilidad significativa, que incluye compromiso respiratorio, valvulopatía cardíaca, discapacidad auditiva, discapacidad visual por opacidad de la córnea, anomalías dentales y hepatomegalia [10]. La compresión de la médula espinal es una complicación común que resulta en deterioro neurológico y a diferencia de otros tipos de MPS los niños con MPS IV A tienen capacidades intelectuales normales al comienzo de la enfermedad [11].

En la forma atenuada, algunos signos clínicos están relacionados con anomalías esqueléticas menores por lo que se requiere de un alto índice de sospecha y exclusión de otras patologías que comparten estas características, a medida que la enfermedad progresá independientemente del fenotipo, comienzan a aparecer más signos y síntomas. La expectativa de vida depende de las complicaciones de la enfermedad, presentando un margen que varía aproximadamente entre 20 y 70 años [2,10]. El desarrollo del conocimiento en las ciencias ómicas y su aplicación nos ha permitido realizar mejoras en los diagnósticos moleculares, correlación fenotipo, endotipo y genotipo, así como a la farmacogenómica y la medicina personalizada [6,8].

El objetivo de este caso es sensibilizar al personal de la salud que esta patología es de gran importancia, ya que esto impacta en el diagnóstico más temprano y tratamiento oportuno con el fin de aminorar la carga de morbimortalidad en estos pacientes.

### Caso clínico

Paciente masculino con inicio a los 10 años de debilidad muscular en miembros inferiores, dificultad para la marcha, subir y bajar escaleras. Sin antecedentes familiares de enfermedades neuromusculares o genéticas, sin consanguinidad entre progenitores. A los 12 años la exploración física muestra un fenotipo de frente amplia, canto amplio, prognatismo, pliegues epicánticos, peso y talla acordes para la edad y género, hiperlaxitud ligamentaria, genu valgo, cifoescoliosis toracolumbar, marcha inestable, aumento trígono de sustentación, anteversión femoral aumentada bilateral, torsión tibial interna, debilidad de flexores de cadera y rodilla, pie plano con retropié en valgo parcialmente estable (Figura 1). Sin compromiso cardiovascular, visceromegalias o alteración cognitiva.

La radiografía panorámica de miembros inferiores evidencia anteversión femoral aumentada bilateral, torsión tibial interna (Figura 2). Resonancia de co-



Figura 1: Fotografía del paciente: Se evidencia genu valgo, aumento trígono de sustentación, anteversión femoral aumentada bilateral, torsión tibial interna, con retropié en valgo parcialmente estable.



Figura 2: Radiografía panorámica miembros inferiores: Se evidencia anteversión femoral aumentada bilateral, torsión tibial interna.

lumna evidencia alteración en la configuración de los cuerpos vertebrales desde el nivel visualizado T9 hasta L5 con tendencia a la plastispondilia y acuñamiento anterior con pico cortical en el nivel L2, por la

morfología de los cuerpos vertebrales se recomienda estudiar displasias espondiloepifisiarias o enfermedad de depósito lisosomal.

Dada la sospecha clínica e imagenológica se solicita medición enzimática gota de sangre colectada en papel de filtro GALNS < 0.03 µmol/l/hr (valor normal: ≥ 0.39 µmol/l/hr). Con posterior confirmación en muestra leucocitaria: Galactosa-6-sulfato sulfatasa, los análisis fueron realizados en aislamientos leucocitarios por sedimentación usando Dextran-Heparina, liberando la enzima por sonicación y ajustando la concentración proteica a 10ug.

La valoración enzimática se realizó mediante un ensayo fluorométrico de punto final usando como sustrato 4 Metilumbelliferyl-β-Gal 6 Sulfato 10mM.

Resultado: 0.10 nmol/mg prot/h (valores de referencia: 2.6 – 35.9 nmol/mg prot/h).

Se solicitó estudio molecular del gen GALNS mediante análisis de secuencia de los genes de interés con secuenciación de nueva generación (NGS). Se utilizó un kit de enriquecimiento Agilent SureSelect personalizado para enriquecer los genes de interés del ADN genómico, seguido de una secuenciación de nueva generación en un sistema Illumina con lecturas de extremos emparejados de 100 pares de bases. Se evidencian dos variantes: Una de significancia patológica: c.901G>T (p.Gly301Cys) en estado heterocigoto; y otra variante de significancia incierta: c.1088T>C (p. Ile363Thr) en estado heterocigoto (Cuadro 1).

**Cuadro 1:** Hallazgos moleculares identificados en el paciente

| GEN   | EXON | ADN<br>CAMBIO | CAMBIO<br>PROTEÍNA | CIGOSIDAD    | ENFERMEDAD<br>ASOCIADA | HERENCIA              | OMIM   |
|-------|------|---------------|--------------------|--------------|------------------------|-----------------------|--------|
| GALNS | 10   | c.1088T>C     | p. Ile363Thr       | heterocigoto | MPS<br>IVA             | Autosomal<br>Recesivo | 612222 |

GALNS: *N-acetilglucosamina-6- enzima sulfato sulfatasa*; ADN: Ácido desoxirribonucleico; OMIM: Herencia mendeliana en línea en el hombre; MPS: Mucopolisacaridosis

**Cuadro 2:** Resultados de predicción del efecto biológico de la variante por diferentes programas de bioinformática.

| Cambio<br>proteína | SIFT: Predicción de cambios de aminoácidos que afectan la función de las proteínas | UMD-predictor        | Análisis funcional a través de modelos ocultos de Markov | Polimorfismo fenotipado V2 | Catador de mutaciones | Analizador de efecto de variación de proteínas |
|--------------------|--|----------------------|--|----------------------------|-----------------------|--|
| p. Ile363Thr       | Prejudicial  | Patogénica (Clase 5) | Patogénica   | Probablemente Patogénica   | Causa enfermedad      | Prejudicial                                    |

Luego de tener todos los estudios se realiza análisis in silico con herramientas de bioinformáticas para predicción del efecto biológico de la variante c.1088T>C: Sorting intolerant from tolerant, Mutation taster, UMD- predictor, funcional analysis through hidden Márkov models, polymorphism phenotyping V2, y protein variation effect analyzer. Se realiza ejercicio de reclasificación de la variante con cambio en la clasificación de significancia clínica de variante de significancia incierta a patogénica (Cuadro 2).

## Discusión

Según el Registro Internacional Morquio A, en el que se tomó como referencia 326 pacientes con diagnóstico clínico y enzimático de MPS IV A de 42 países incluido Colombia. El 68% de los pacientes tenían fenotipo grave, 15% fenotipo intermedio, 10% fenotipo leve, y 7% desconocido [2,6,12].

El promedio de edad de aparición de los síntomas fue 2,1 años y menos del 50% de los pacientes fueron diagnosticados antes de los 5 años. Los datos de este registro también mostraron que los signos iniciales más comunes son estatura baja (86%), deformidad ósea, incluidas las rodillas (81%), columna vertebral (72%), tórax (66%), muñecas (66 %), caderas (65,6 %), piernas (61%) y tobillos (58%), laxitud articular (64%), dificultad de movimiento articular (62%) y marcha anormal (59%) [9].

En un estudio descriptivo transversal de caracterización de 12 paciente con MPS IV A en el sur occidente colombiano se evidenció que todos los pacientes tenían deformidad osteoarticular, talla baja y alteraciones de la marcha.

Otros hallazgos encontrados incluyeron alteraciones cardiovasculares como insuficiencia mitral leve y esclerosis mitral y aórtica, cambios pulmonares restrictivos moderados a severos, defectos refractivos, hipoacusia neurosensorial, hipoplasia vertebral, platispondilia, cifosis e hiperlaxitud articular, estre-

amiento del canal espinal entre C2 y C3, genu valgum bilateral y displasia de cadera [7].

El caso presentado muestra características atenuadas de la enfermedad con compromiso osteoarticular como manifestación clínica principal sin involucrar la talla, sin compromiso de otros órganos y sistemas que por lo general se asocian a esta patología.

La variante sin sentido c.1088T>C (p. Ile363Thr) da como resultado la sustitución del aminoácido isoleucina de la posición 363 de la proteína por treonina. Esta variante no ha sido reportada en las diferentes bases de datos como ClinVar y LOVD como causante de la enfermedad. Tampoco se ha observado en la población general en la búsqueda en bases de datos de poblaciones de genomas como dbVar.

Los análisis in silico predicen un efecto potencialmente perjudicial de este cambio en la función de la proteína. La variante sin sentido c.1088T>C da como resultado la sustitución del codón de isoleucina en la posición de aminoácido 363 con un codón de treonina (p. Ile363Thr), hasta el momento no había pruebas suficientes para determinar la patogenicidad de esta variante, por lo tanto, se clasificó como una variante de significado incierto. Pero a través del uso de herramientas de bioinformática como SIFT: Predicción de cambios de aminoácidos que afectan la función de las proteínas, UMD- predictor, Análisis funcional a través de modelos ocultos de Marko, Polimorfismo fenotipado V2, Catador de mutaciones y Analizador de efecto de variación de proteínas y mediante ejercicio de reclasificación de variantes se logra establecer la significancia patogénica de la variante, de esta forma se reporta como variante nueva asociada a MPS IV-A.

## Conclusión

La MPS IV-A de manera atenuada representa un reto diagnóstico para profesionales de la salud por lo que

es de gran importancia identificar de modo precoz manifestaciones clínicas leves de la enfermedad y remitir de manera oportuna a medicina especializada para realizar un abordaje completo, hacer un diagnóstico oportuno y disminuir la carga de morbi-mortalidad en esta población. A través del uso de herramientas de bioinformática se logró establecer la significancia patogénica de la variante sin sentido

c.1088T>C (p. Ile363Thr) y de esta forma se reportarla como variante nueva asociada a MPS IV-A.

## Agradecimientos

Agradecemos al paciente y a su madre por permitir la publicación de este caso clínico.

## REFERENCIAS

- [1] Balakrishnan U. Inborn Errors of Metabolism-Approach to Diagnosis and Management in Neonates. Indian J Pediatr. 2021 Jul;88(7):679-689. doi: 10.1007/s12098-021-03759-9. Epub 2021 Jun 7. PMID: 34097229.
- [2] Sawamoto K, Álvarez González JV, Piechnik M, Otero FJ, Couce ML, Suzuki Y, Tomatsu S. Mucopolysaccharidosis IVA: Diagnosis, Treatment, and Management. Int J Mol Sci. 2020 Feb 23;21(4):1517. doi: 10.3390/ijms21041517. PMID: 32102177; PMCID: PMC7073202.
- [3] Michaud M, Belmatoug N, Catros F, Ancellin S, Touati G, Levade T, Gaches F. Mucopolysaccharidoses: quand y penser ? [Mucopolysaccharidosis: A review]. Rev Med Interne. 2020 Mar;41(3):180-188. French. doi: 10.1016/j.revmed.2019.11.010. Epub 2020 Jan 17. PMID: 31959364.
- [4] Regier DS, Oetgen M, Tanpaiboon P. Mucopolysaccharidosis Type IVA. 2013 Jul 11 [Updated 2021 Jun 17]. In: Adam MP, Mirzaa GM, Pagon RA, et al., editors. GeneReviews® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2023. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK148668/>
- [5] Caciotti A, Tonin R, Rigoldi M, Ferri L, Catarzi S, Cavicchi C et al. Optimizing the molecular diagnosis of GALNS: novel methods to define and characterize Morquio-A syndrome-associated mutations. Hum Mutat. 2015 Mar;36(3):357-68. doi: 10.1002/humu.22751. PMID: 25545067.
- [6] Gómez AM, García-Robles R, Suárez-Obando F. Estimación de las frecuencias de las mucopolisacaridoses y análisis de agrupamiento espacial en los departamentos de Cundinamarca y Boyacá. Biomédica. 2012;32(4): 602-609. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v32i4.574>
- [7] Moreno Giraldo LJ, Escudero Rodríguez ÁM, Sánchez Gómez A, Satizabal Soto JM. Clinical and molecular characteristics of colombian patients with mucopolysaccharidosis IVA, and description of a new galns gene mutation. Mol Genet Metab Rep. 2018 Jul 20; 16:53-56. doi: 10.1016/j.ymgmr.2018.06.008. PMID: 30094185; PMCID: PMC6072674.
- [8] Giraldo LJ, Satizabal JM, Gómez AS. Determination of the Population Allelic Frequency of the Variants of the MPS Complex in Southwestern Colombia. J Inborn Errors Metab Screen. e20210021. DOI: <https://doi.org/10.1590/2326-4594-JIEMS-2021-0021>.
- [9] Montaño AM, Tomatsu S, Gottesman GS, Smith M, Orii T. International Morquio A Registry: clinical manifestation and natural course of Morquio A disease. J Inherit Metab Dis. 2007 Apr;30(2):165-74. doi: 10.1007/s10545-007-0529-7. Epub 2007 Mar 8. PMID: 17347914.
- [10] Tomatsu S, Yasuda E, Patel P, Ruhnke K, Shimada T, Mackenzie WG et al. Morquio A syndrome: diagnosis and current and future therapies. Pediatr Endocrinol Rev. 2014 Sep;12 Suppl 1(0 1):141-51. PMID: 25345096; PMCID: PMC4259875.
- [11] Khan S, Alméciga-Díaz CJ, Sawamoto K et al. Mucopolysaccharidosis IVA and glycosaminoglycans. Mol Genet Metab. 2017 Jan-Feb;120(1-2):78-95. doi: 10.1016/j.ymgme.2016.11.007. Epub 2016 Nov 29. PMID: 27979613; PMCID: PMC5293636.
- [12] Morrone A, Caciotti A, Atwood R et al. Morquio A syndrome-associated mutations: a review of alterations in the GALNS gene and a new locus-specific database. Hum Mutat. 2014 Nov;35(11):1271-9. doi: 10.1002/humu.22635. Epub 2014 Sep 17. PMID: 25137622; PMCID: PMC4238747.