



Síndrome de Morquio: nueva mutación del gen GALNS en dos hermanos del sur-occidente colombiano. Análisis clínico, molecular y bioinformático

Harry Pachajoa,^{1,2,*} Felipe Ruiz-Botero,¹ María Fernanda Hernández-Amariz,¹ Sabrina Eichler,³ Andrés Orlando Castillo-Giraldo¹

¹ Centro de Investigaciones en Anomalías Congénitas y Enfermedades Raras (CIACER), Facultad de Ciencias de la Salud-Universidad Icesi. Cali, Colombia; ² Fundación Clínica Valle del Lili. Cali, Colombia; ³ Director Diagnostic Analytics Centogene. Rostock, Germany.

RESUMEN

Introducción: La mucopolisacaridosis tipo IVA es una enfermedad de depósito lisosomal causada por una mutación del gen GALNS, lo que provoca una deficiencia enzimática que resulta en la acumulación de queratán sulfato y condroitín sulfato en ciertos tejidos. Se expresa como una displasia esquelética generalizada que da como resultado baja estatura, *Pectus carinatum*, platispondilia, hipoplasia odontóide, cifoescoliosis y genu valgo. **Material y métodos:** Hermanos de 6 y 9 años con características clínicas de síndrome de Morquio; se realiza secuenciación del gen GALNS y se detectan dos mutaciones en ambos, una en el exón 3 (c.280C>T p.R94C), y otra en el exón 9 (c.998G>A p.G333D), la cual se determinó como posiblemente patológica. Se realiza análisis bioinformático de las mutaciones detectadas mediante un análisis *in silico* de homología de secuencias múltiple, utilizando los Softwares SIFT, PolyPhen, nsSNPAnalyzer, I-Mutant, FOLD X, y DeepView-Swiss-PdbViewer. **Discusión:** Los análisis realizados mostraron que los cambios de aminoácidos causados por la presencia de estos SNPs en la proteína podrían afectar tanto su estructura tridimensional como su funcionamiento, evidenciando efectos negativos con relación a la estabilidad de la proteína, accesibilidad a solventes y polaridad, por lo que se les considera marcadores de riesgo para presencia de enfermedades.

Palabras clave: Síndrome de Morquio, mucopolisacaridosis, terapia de reemplazo enzimático, bioinformática.

ABSTRACT

Introduction: Mucopolysaccharidosis type IV A, or Morquio syndrome, is an autosomal recessive lysosomal storage disorder that is caused by mutations on the GALNS gene, resulting in the accumulation of keratan sulfate and chondroitin sulfate in certain tissues. It is expressed as generalized skeletal dysplasia including short stature, *Pectus carinatum*, platyspondylia, odontoid hypoplasia, kyphoscoliosis, and genu valgum. **Material and methods:** 9 and 6 six year old brothers with clinical characteristic of severe Morquio syndrome. GALNS gene sequencing is performed detecting two mutations in both brothers, the first one in exon 3 (c.280C>T p.R94C), and a new mutation in exon 9 (c.998G>A p.G333D), which was determined as potentially pathological. Bioinformatic analysis of the mutations via an *in silico* analysis of multiple sequence homology, using the Softwares SIFT, PolyPhen, nsSNPAnalyzer, I-Mutant, FOLD X, and DeepView-Swiss-PdbViewer. **Discussion:** The analyzes showed that the aminoacid changes caused by the presence of these SNPs in the protein could affect its three dimensional structure and its operation, evidencing negative effects in relation to the protein stability, solvent accessibility and polarity which makes them strong candidates to be denominated risk markers for this disease.

Key words: Morquio syndrome, mucopolysaccharidosis, enzyme replacement therapy, bioinformatics.

* Correspondencia: HP, hmpachajoa@icesi.edu.co

Conflicto de intereses: Los autores declaran que no tienen.

Citar como: Pachajoa H, Ruiz-Botero F, Hernández-Amariz MF, Eichler S, Castillo-Giraldo AO. Rev Mex Pediatr 2016; 86(3):85-92. [Morquio syndrome: new heterozygous mutation of the GALNS gene in two siblings from south-west Colombia. Clinical, molecular, and bioinformatic analysis]

INTRODUCCIÓN

La mucopolisacaridosis tipo IVA (MPS IVA), también conocida como síndrome de Morquio A, es una enfermedad metabólica perteneciente al grupo de enfermedades de depósito lisosomal de herencia autosómica recesiva.¹

Fue descrita por primera vez en 1929 por el pediatra uruguayo Luis Morquio y casi simultáneamente por el radiólogo James Brailsford en Inglaterra, por lo que es conocida también como el síndrome de Morquio-Brailsford. Presenta una prevalencia de 1 en 200,000 personas, aunque prevalencias más altas han sido descritas entre irlandeses y franco-canadienses, entre otras poblaciones.² Se han descrito representaciones de personas con este síndrome en cerámica de 2,000 años de antigüedad en culturas prehispánicas del suroccidente colombiano.³

Esta enfermedad es causada por mutaciones o deleciones que se presentan en el gen que codifica la enzima lisosomal N-acetilgalactosamina-6-sulfatas (GALNS), causando deficiencias que llevan a la acumulación de ciertos glicosaminoglicanos a nivel lisosomal. Esta mucopolisacaridosis es de expresividad variable, pero en general presenta un fenotipo de displasia esquelética que incluye baja estatura, genu valgo, *Pectus carinatum*, hipoplasia odontoide, cifosis e hiperlaxitud. Otros sistemas que se pueden ver afectados son el visual, auditivo, cardiovascular y respiratorio.⁴

Se han descrito más de 180 mutaciones en exones diferentes del gen GALNS, por lo que se le atribuye una amplia variabilidad fenotípica.^{5,6} Se presenta el análisis clínico molecular de dos hermanos de 9 y 6 años con síndrome de Morquio en quienes se identifica una mutación reportada en dos ocasiones en el exón 3, la c.280C>T p.R94C, y una mutación nueva en el exón 9, la c.998G>A p.G333D. Se realiza una correlación genotipo-fenotipo de éstas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se obtuvo el consentimiento informado de los padres de los pacientes; posteriormente se realizó búsqueda y revisión de historia clínica prenatal y perinatal; se realizó toma de muestra de sangre siguiendo los protocolos de la institución responsable. Todos los procedimientos fueron realizados conforme los estándares institucionales y la declaración de Helsinki.

Para el análisis molecular se realizó secuenciación del gen GALNS para identificar la mutación causal, posterior a lo cual se efectuó análisis bioinformático del impacto funcional de las mutaciones detectadas mediante un análisis *in silico* de homología de secuencias múltiple. Para dicho análisis se utilizó como secuencia base de aminoácidos la proteína humana GALNS P34059, la cual fue seleccionada de un total de 10 secuencias sometidas a la base de datos UNIPROT

(<http://www.uniprot.org/uniprot/P34059>), siendo ésta la que presentaba un estatus de revisión por curación aprobado por UniProtKb, con un puntaje de anotación de medida heurística de 5 sobre 5, lo cual convierte a la secuencia como idónea para los análisis *in silico*. Para el análisis se utilizaron los software: SIFT, PolyPhen, nsSNPAnalyzer, I-Mutant, FOLD X, y DeepView-Swiss-PdbViewer.

Reporte de caso

Pacientes hermanos de origen colombiano, raza mestiza y padres no consanguíneos, con historia prenatal materna que no evidencia exposición a teratógenos u otros antecedentes de importancia para ambas gestas. Los pacientes asisten a la consulta de genética a la edad de nueve y seis años de edad, respectivamente, con hallazgos clínicos sugestivos de síndrome de Morquio que incluyen: displasia espondiloepifisaria, baja talla, prognatismo, tronco y cuello cortos, cifoescoliosis toracolumbar, aplanamiento vertebral, displasia de cadera, *Pectus carinatum*, desviación ulnar en la muñeca, deformidades epifisiales en huesos tubulares, hiperlaxitud y genu valgo (*Figura 1*).



Figura 1. Los pacientes de seis y nueve años de edad con hallazgos clínicos sugestivos de síndrome de Morquio que incluyen: displasia espondiloepifisaria, baja talla, tronco y cuello cortos, cifoescoliosis toracolumbar, *Pectus carinatum*, deformidades epifisiales en huesos tubulares, y genu valgo.

El paciente de mayor edad también presenta alteraciones en la morfología de los cuerpos vertebrales con aplanamiento de las vértebras y prominencia de los discos con hipoplasia de la odontoides e hipertrofia ligamentaria a altura de C1-C2 con efecto compresivo a nivel medular posterior con desplazamiento anterior de C1; también se notan cambios morfológicos de los cuerpos vertebrales torácicos con irregularidad de los platillos y pérdida de la altura de estos cuerpos vertebrales. Hay severa cifosis torácica inferior condicionada por malformación congénita corporal de las vértebras torácicas T11 y T12, con pérdida severa de altura y angulación, sin compresión del cordón medular (*Figura 2*).

Se realizan estudios complementarios en los cuales se evidencia actividad enzimática disminuida para GALNS. En ambos hermanos se realiza una valoración profunda, con test de marcha en seis minutos, pruebas de función pulmonar, ecocardiograma, imágenes de columna, entre otros exámenes. Se consideraron elegibles para inicio de terapia de reemplazo enzimático, la cual tiene pendiente su aprobación por la entidad de salud correspondiente.

Estudios bioquímicos

En el patrón de excreción urinario de mucopolisacáridos, detectado por cromatografía de MPS en orina, se

encontró un patrón de queratán sulfato y condroitin sulfato aumentado. Posteriormente se realizaron mediciones de la enzima n-acetilgalactosamina 6-sulfatasa en leucocitos, encontrándose valores no detectables, por ausencia o disminución de la actividad de la enzima.

Análisis molecular

Se realizó extracción de ADN y secuenciación del gen GALNS en un secuenciador ABI 3500, para identificar la mutación causal. El estudio molecular en ambos pacientes evidenció una mutación heterocigótica en el exón 3 (c.280C>T p.R94C) y una nueva mutación heterocigótica no reportada en la literatura en el exón 9 (c.998G>A p.G333D) (*Figuras 3 y 4*).

RESULTADOS

Análisis bioinformático

Evaluación del impacto funcional de las mutaciones R94C y G333D en la proteína GALNS mediante un análisis *in silico* de homología de secuencias múltiple.

- Obtención de la secuencia de aminoácidos de la proteína humana GALNS



Figura 2. A) Resonancia nuclear magnética de columna cervical; se observa aplanamiento de las vértebras cervicales y dorsales visibles, alteraciones a nivel atlantoaxial con odontoides hipoplásica e hipertrofia ligamentaria asociada, la cual produce desplazamiento anterior del arco anterior de C1, en contacto con la medula, posteriormente sin signos de mielopatía. B) Resonancia nuclear magnética de columna torácica. Se observan cambios morfológicos de los cuerpos vertebrales torácicos con irregularidad de los platillos y pérdida de la altura de estos cuerpos vertebrales. Se aprecia severa cifosis torácica inferior condicionada por malformación congénita corporal de las vértebras torácicas T11 y T12; éstas muestran severa pérdida de altura, especialmente hacia los contornos anteriores, con aproximadamente 90° de angulación, sin compresión del cordón medular.

El código de identificación de la secuencia de aminoácidos de la proteína que se analizó fue P34059, la cual fue seleccionada de un total de 10 secuencias sometidas a la base de datos UNIPROT (<http://www.uniprot.org/uniprot/P34059>), y que presentaba un estatus de revisión por curación aprobado por UniProtKb, con un puntaje de anotación de medida heurística de 5 sobre 5, secuencia idónea para los análisis *in silico*.

- Análisis con el servidor SIFT

El servidor web SIFT 5.2.2 (*Sorting Intolerant From Tolerant*) predice si una sustitución en la secuencia de aminoácidos de una proteína afecta su función mediante un análisis *in silico* por homología de secuencias teniendo en cuenta las propiedades físicas de los aminoácidos.⁷ La secuencia de aminoácidos de la proteína GALNS P34059 fue sometida al programa SIFT 5.2.2, el cual realiza una búsqueda de secuencias similares,

seleccionando las estrechamente relacionadas y que pueden compartir una función similar para realizar con ellas una alineación múltiple y calcular las probabilidades normalizadas para todas las sustituciones posibles en cada posición de la alineación. Las sustituciones en cada posición que presenten un valor de índice de tolerancia menor a 0.05 se asume que afectan negativamente la función de la proteína y aquellas cuyos valores sean mayores o iguales a 0.05 se asume en la predicción que serán toleradas y no afectarán la función de la proteína de manera significativa.^{8,9}

Los resultados de la predicción del servidor SIFT para la secuencia de aminoácidos de la proteína humana GALNS con la presencia de las mutaciones R94C y G333D se presentan en el *cuadro 1*. De acuerdo con la clasificación propuesta por Ng y Henikoff 2003,⁷ las mutaciones con un índice de tolerancia bajo tendrán un mayor impacto funcional en la proteína. En el caso de los R94C y G333D bajo estudio, ambos presentaron

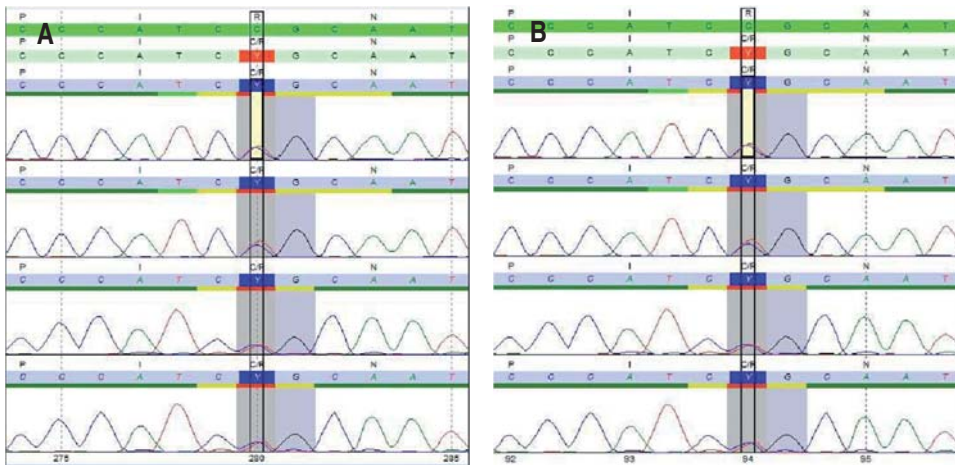


Figura 3.

Mutación heterocigótica: A) R94C cDNA, B) R94C AA.

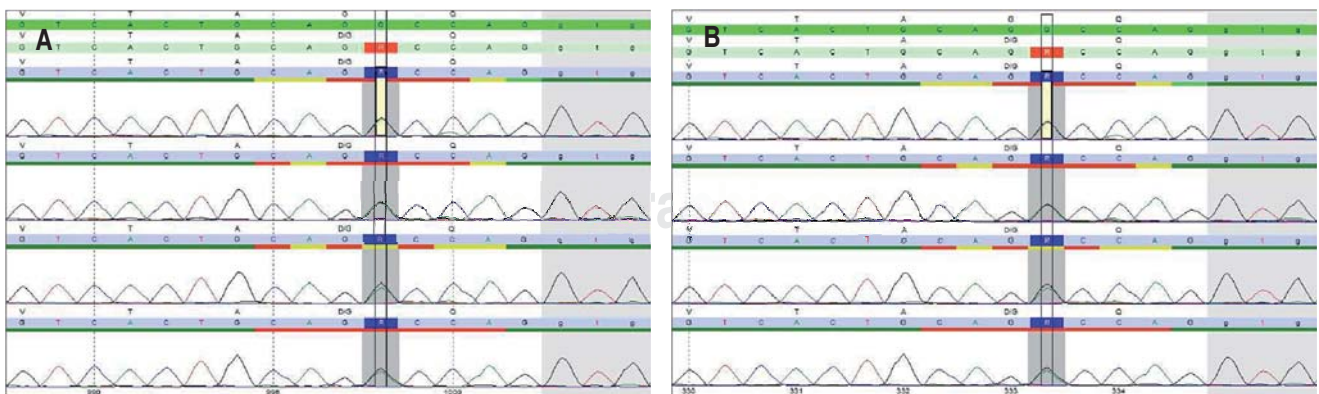


Figura 4. Mutación heterocigótica: A) G333D cDNA, B) G333D AA.

Cuadro 1. Índices de tolerancia de las mutaciones R94C y G333D para la proteína GALNS. Cada fila corresponde a la posición en la proteína de referencia. Cada columna corresponde a uno de los veinte aminoácidos. Las sustituciones con índices bajos de tolerancia que se predicen perjudiciales para la función de la proteína < 0.05 se resaltan en negritas. En el caso de las mutaciones R94C y G333D se resaltan con subrayado.

Posición	A	C	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y
93I	0.02	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00	1.00	0.01	0.08	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.02	0.83	0.00	0.01
94R	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
95N	0.42	0.07	0.24	0.31	0.12	0.17	0.11	0.17	0.32	0.22	0.09	0.30	0.18	0.22	0.21	0.81	1.00	0.26	0.04	0.15
332A	0.92	0.03	0.03	0.04	0.01	0.14	0.01	0.02	0.03	0.03	0.01	0.02	1.00	0.02	0.02	0.13	0.06	0.06	0.00	0.01
333G	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
334Q	0.08	0.01	0.05	0.11	0.02	0.05	0.04	0.03	0.27	0.05	0.02	0.06	0.04	1.00	0.44	0.07	0.07	0.04	0.01	0.02

índices de tolerancia bajos (< 0.05), lo que sugiere que están afectando la función normal de la proteína.

- Análisis con el servidor PolyPhen

El servidor web PolyPhen (versión 2) (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>) predice la probabilidad de daño que genera un SNP de aminoácidos en la estructura y función de una proteína mediante el uso de las reglas empíricas específicas.¹⁰ Para el SNPs R94C se encontró una probabilidad de daño completa para la proteína GALNS, es decir, con un valor de 1, con una sensibilidad de 0 y una especificidad de 1. Por su parte, para el SNP G333D se encontró una probabilidad de daño alta de 0.822, con una sensibilidad y especificidad para la predicción de 0.74 y 0.88, respectivamente.

- Análisis con el servidor nsSNPAnalyzer

Este servidor web utiliza un método de aprendizaje de máquina llamada Random Forest para clasificar los SNPs. Este servidor funciona usando un conjunto de datos de SNP curados a partir de las bases de datos de SwissProt. El servidor nsSNPAnalyzer (<http://snpanalyzer.uthsc.edu/>) calcula tres tipos de archivos de entrada, los cuales son: 1) la estructural del SNP, es decir, la accesibilidad a disolventes, su polaridad y su estructura secundaria;¹¹ 2) la probabilidad normalizada para que se presente la sustitución mediante una alineación múltiple de secuencias;⁸ y 3) la similitud y disimilitud entre el aminoácido original y el nuevo aminoácido (SNP).

En este estudio realizamos un análisis estructural utilizando el cristal de la proteína GALNS con código 4FDI sometida a la base de datos del Protein Data Bank con libre acceso en Internet (<http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=4FDI>). Las dos mutaciones de aminoácidos (R94C y G333D) fueron sometidas al servidor nsSNPAnalyzer junto con secuencia de la proteína de GALNS en formato FASTA y el cristal de la proteína. Los resultados mostraron que para ambos SNPs se puede predecir un efecto en el fenotipo de la proteína y por ende tener un efecto aditivo en la etiología de la enfermedad. Los resultados se observan en el *cuadro 2*.

- Modelamiento con I-Mutant y el algoritmo FOLD X

El servidor web I-Mutant (versión 2.0) (<http://folding.uib.es/i-mutant/i-mutant2.0.html>) es una herra-

mienta basada en neural network para el análisis de estabilidad de las proteínas y sus alteraciones tomando en cuenta las mutaciones que ocurren en un solo sitio. Una secuencia de proteína en formato FASTA obtenida en UniProt se utiliza como entrada para predecir el efecto mutacional sobre la estabilidad de la proteína. El servidor I-Mutant también proporciona los valores de energía libre generados por la alteración usando el algoritmo informático FOLD-X. Este algoritmo estima cuantitativamente las interacciones que facilitan la estabilidad de las proteínas. La herramienta FOLD-X proporciona la comparación entre el modelo de la proteína sin la mutación versus con la mutación y evalúa específicamente el impacto que ejerce la mutación en los enlaces débiles de Van der Waals que influyen, en gran medida, en la descomposición de energía. A veces, las mutaciones pueden causar y reducir la tensión en la estructura nativa original.^{12,13}

El análisis del efecto de R94C y G333D se realizó bajo condiciones ideales, con pH = 7.0 y una temperatura de 27 °C. Los resultados se presentan en el *cuadro 3*. Al realizar el análisis utilizando la estructura cristalina de la proteína humana GALNS 4FDI, se puede predecir que para ambas posiciones la energía libre de Gibbs disminuye, lo que sugiere un efecto importante nega-

tivo en la estabilidad de la estructura tridimensional de la proteína por parte de ambos SNPs.

- Análisis de formación de puentes de hidrógeno por mutagénesis *in silico*

De forma virtual se analizó la formación de puentes de hidrógeno en el cristal de la proteína GALNS P34059, posterior a la realización de una mutagénesis *in silico* en las posiciones correspondientes a los residuos 94 (R por C) y 333 (G por D) utilizando el programa DeepView-Swiss-PdbViewer.¹⁴

El análisis estructural de la proteína GALNS mostró la formación de dos puentes de hidrógeno entre la arginina de la posición 94 con la leucina de la posición 91, y posterior a la mutagénesis *in silico* R94C se observó la formación de cuatro puentes de hidrógeno entre el nuevo aminoácido cisteína 94 y la leucina 91 (*Figura 5A*). Además, se notó una importante disminución en la nube de electrones en esta posición. Para el residuo 333 de glicina se observó la formación de un puente de hidrógeno con la glicina 66, pero posterior a la mutagénesis *in silico* G333D se registró la formación de dos puentes de hidrógeno entre el ácido aspártico 333 y la glicina 66 con un leve cambio en la estructura de la nube de electrones (*Figura 5B*).

DISCUSIÓN

En estos hermanos se encontraron dos mutaciones heterocigóticas; una de ellas, en el exón 3 (c.280C>T p.R94C), que había sido reportada en dos ocasiones por Cole et al. en 1996, y por Dung et al. en 2013, coincidiendo en que ésta se asocia con una expresión fenotípica severa de la enfermedad. La otra mutación encontrada se localizó en el exón 9 (c.998G>A p.G333D); ésta no ha sido reportada previamente.^{6,15}

En el presente estudio se analizó *in silico* la presencia de las mutaciones R94C y G333D en la proteína GALNS como una herramienta para predecir sus efectos en el fenotipo de la proteína que se pueda relacionar con la enfermedad de Morquio. Los análisis realizados mostraron que los cambios de aminoácidos encontrados por la presencia de estas mutaciones en la proteína podrían afectar tanto su estructura tridimensional como su funcionamiento. Para ambas mutaciones se encontraron efectos negativos en relación con la estabilidad de la proteína, accesibilidad a solventes y polaridad, que los hacen marcadores de riesgo para la aparición de dicha enfermedad.

Cuando se analizaron las mutaciones a nivel del cristal de la proteína GALNS, los resultados sugirieron

Cuadro 2. Predicción del efecto en el fenotipo de la proteína por parte de las mutaciones R94C y G333D.

SNP	Fenotipo	Accesibilidad a solvente	Polaridad	Estructura secundaria
R94C	Enfermo	0.768	0.552	Giro
G333D	Enfermo	0.096	0.771	Giro

Cuadro 3. Efecto de las mutaciones R94C y G333D sobre la energía libre de la estructura tridimensional de la proteína.

Posición	Aminoácido nativo	Mutación	Estabilidad	DDG (Kcal/mol)
94	R	C	Disminuyó	-0.19
333	G	D	Disminuyó	-1.19

DDG = Energía libre de la proteína con la mutación-energía libre de la proteína sin la mutación.

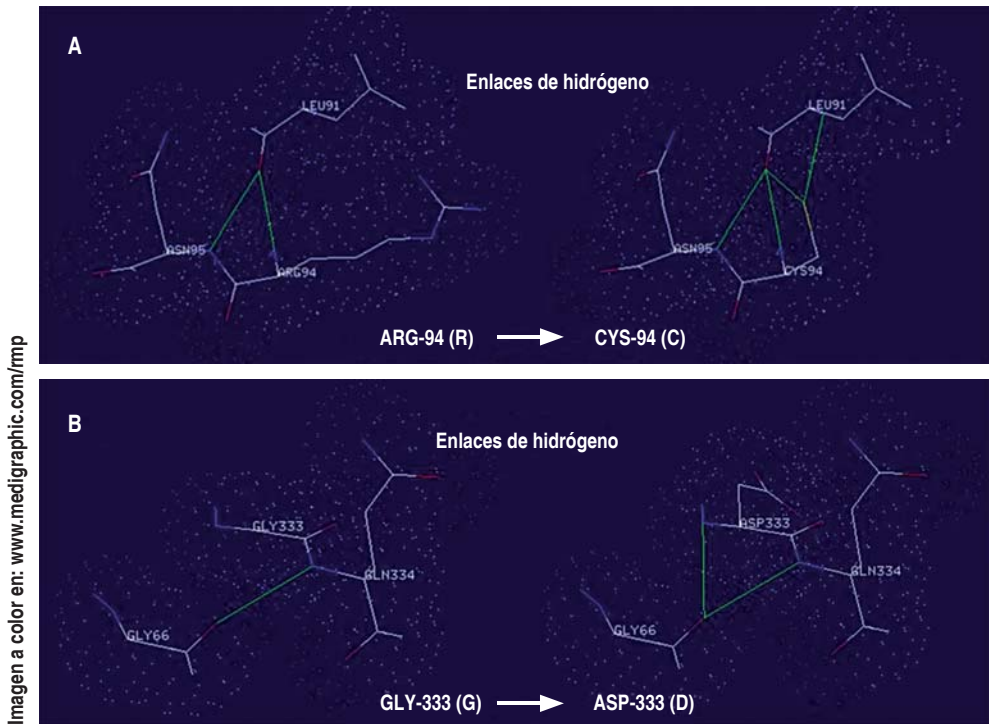


Figura 5.

Efecto de las mutaciones R94C y G333D sobre la formación de puentes de hidrógeno en la estructura terciaria de la proteína GALNS. **A)** Análisis para la mutación R94C. **B)** Análisis para la mutación G333D. El análisis fue realizado con el programa DeepView-Swiss-PdbViewer (<http://spdbv.vital-it.ch/>). Los enlaces o puentes de hidrógeno se representan en color verde.

que los cambios podrían traer consigo un aumento en formación de puentes de hidrógeno y variación en la distribución de las nubes de electrones para estos residuos, lo que podría afectar la estructura tridimensional de la proteína. Lo anterior sugiere que la presencia tanto de la mutación R94C como el G333D está asociada al fenotipo de la MPS IVA.

Los pacientes descritos en este artículo presentan una displasia espondiloepifisaria e hiperlaxitud que se manifiesta en retardo del crecimiento, baja estatura con tronco y cuello cortos, cifosis toracolumbar, aplanamiento vertebral, displasia de cadera, genu valgo y *Pectus carinatum*. En el estudio de estos pacientes es necesario el seguimiento radiológico mediante el cual se puedan identificar y evaluar las manifestaciones musculoesqueléticas descritas;¹⁶⁻¹⁸ así mismo, debemos dar seguimiento al desarrollo antropométrico de los pacientes, con base en tablas adaptadas para el síndrome que permitan monitorear la enfermedad e incluso evaluar la efectividad de las terapias que existen.¹⁹

Hasta hace poco no existía una terapia efectiva para este síndrome y el tratamiento era principalmente paliativo. Los estudios muestran que es necesario un abordaje médico-quirúrgico multidisciplinario, incluyendo ortopedia, neumología, cardiología, anes-

tesia y terapia física.^{6,20,21} Sin embargo, recientemente fue aprobada por la *Food and Drug Administration* (FDA) la terapia de reemplazo enzimático (ERT), la cual probó beneficios principalmente a nivel de la marcha y capacidad funcional, viéndose un incremento significativo en el test de marcha de seis minutos. Es importante un seguimiento continuo de estos pacientes para determinar los efectos de la terapia de reemplazo hormonal.

Se recomienda realizar estudios genéticos y aconsejar objetiva y adecuadamente a las parejas que desean tener hijos pero en quienes existen antecedentes familiares de síndrome de Morquio, así como para aquellos padres cuyos hijos manifiestan el síndrome. Debemos ayudarles a entender la condición, el patrón de herencia de ésta y ofrecerles las alternativas de tratamiento existentes, haciendo la aclaración de que se trata de terapias paliativas y manejos experimentales. Así mismo, se debe ofrecer diagnóstico prenatal cuando hay deseo de concepción.²²

Agradecimientos

Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación Colciencias y Centogene (Alemania).

REFERENCIAS

1. Northover H, Cowie RA, Wraith JE. Mucopolysaccharidosis type IVA (Morquio syndrome): a clinical review. *J Inherit Metab Dis*. 1996; 19(3): 357-365.
2. Tomatsu S, Okamura K, Taketani T, Orii KO, Nishioka T, Gutiérrez MA et al. Development and testing of new screening method for keratan sulfate in mucopolysaccharidosis IVA. *Pediatr Res*. 2004; 55(4): 592-597.
3. Pachajoa H, Rodríguez CA, Isaza C. Possible case of Morquio syndrome in the pottery of Tumaco-Tolita culture. *Rev Neurol*. 2009; 48(1): 52.
4. Hendriksz CJ, Harmatz P, Beck M, Jones S, Wood T, Lachman R et al. Review of clinical presentation and diagnosis of mucopolysaccharidosis IVA. *Mol Genet Metab*. 2013; 110(1-2): 54-64.
5. Wang Z, Zhang W, Wang Y, Meng Y, Su L, Shi H et al. Mucopolysaccharidosis IVA mutations in Chinese patients: 16 novel mutations. *J Hum Genet*. 2010; 55(8): 534-540.
6. Dũng VC, Tomatsu S, Montañõ AM, Gottesman G, Bober MB, Mackenzie W et al. Mucopolysaccharidosis IVA: correlation between genotype, phenotype and keratan sulfate levels. *Mol Genet Metab*. 2013; 110(1-2): 129-138.
7. Ng PC, Henikoff S. SIFT: predicting amino acid changes that affect protein function. *Nucleic Acids Res*. 2003; 31(13): 3812-3814.
8. Ng PC, Henikoff S. Predicting deleterious amino acid substitutions. *Genome Res*. 2001; 11(5): 863-874.
9. Ng PC, Henikoff S. Predicting the effects of amino acid substitutions on protein function. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2006; 7: 61-80.
10. Ramensky V, Bork P, Sunyaev S. Human non-synonymous SNPs: server and survey. *Nucleic Acids Res*. 2002; 30(17): 3894-3900
11. Bowie JU, Luthy R, Eisenberg D. A method to identify protein sequences that fold into a known three-dimensional structure. *Science*. 1991; 253: 164-170.
12. Abagyan R, Totrov M. Biased probability Monte Carlo conformational searches and electrostatic calculations for peptides and proteins. *J Mol Biol*. 1994; 235: 983-1002.
13. Schymkowitz J, Borg J, Stricher F, Nys R, Rousseau F, Serrano L. The FoldX web server: an online force field. *Nucleic Acids Res*. 2005; 33: 382-388.
14. Guex N, Peitsch MC. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis*. 1997; 18: 2714-2723.
15. Cole DE, Fukuda S, Gordon BA, Rip JW, LeCouteur AN, Rupar CA et al. Heteroallelic missense mutations of the galactosamine-6-sulfate sulfatase (GALNS) gene in a mild form of Morquio disease (MPS IVA). *Am J Med Genet*. 1996; 63(4): 558-565.
16. Montañõ 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; 30(2): 165-174.
17. Lankaster B, Whitehouse M, Gargan M. Morquio syndrome. *Current Orthopaedics*. 2006; 20: 128-131.
18. Lachman R, Martin KW, Castro S, Basto MA, Adams A, Teles EL. Radiologic and neuroradiologic findings in the mucopolysaccharidoses. *J Pediatr Rehabil Med*. 2010; 3(2): 109-118.
19. Montañõ AM, Tomatsu S, Brusius A, Smith M, Orii T. Growth charts for patients affected with Morquio A disease. *Am J Med Genet A*. 2008; 146A(10): 1286-1295.
20. Tomatsu S, Montañõ AM, Oikawa H, Smith M, Barrera L, Chinen Y et al. Mucopolysaccharidosis type IVA (Morquio A disease): clinical review and current treatment. *Curr Pharm Biotechnol*. 2011; 12(6): 931-945.
21. Algahim MF, Almassi GH. Current and emerging management options for patients with Morquio A syndrome. *Ther Clin Risk Manag*. 2013; 9: 45-53.
22. Oulahiane A, Elhaddad N, Ouleghzal H, Gaouzi A. Moderated form of Morquio syndrome: an unknown cause of short stature (three case reports). *Arch Pediatr*. 2011; 18(9): 979-982.