

Marcelo Mori

Identificação de mutações do gene G6PC de amostras de sangue colhidas em papel filtro de pacientes com glicogenose tipo Ia (Doença de von Gierke)

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Medicina.

São Paulo
-2008-

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Marcelo Mori

Identificação de mutações do gene G6PC de amostras de sangue colhidas em papel filtro de pacientes com glicogenose tipo Ia (Doença de von Gierke)

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Medicina.

Área de Concentração: Pediatria
Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Longui

São Paulo
-2008-

FICHA CATALOGRÁFICA

**Preparada pela Biblioteca Central da
Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo**

Mori, Marcelo

Identificação de mutações no gene G6PC de amostras de sangue colhidas em papel filtro de pacientes com glicogenose tipo Ia (Doença de von Gierke)./ Marcelo Mori. São Paulo, 2008.

Tese de Mestrado. Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo – Curso de pós-graduação em Medicina.

Área de Concentração: Pediatria

Orientador: Carlos Alberto Longui

1. Doença de depósito de glicogênio tipo I 2. Mutação 3.

Análise de seqüência de DNA

DEDICATÓRIA

A meus pais, Emilia e Caio,
cuja, dedicação, atenção e orientação
possibilitaram minha formação pessoal.

À minha esposa Bianca, companheira, que sempre
me apóia em todas as etapas de minha vida com
carinho e compreensão.

Aos meus mestres Elizabeth, Clarice e
Mauro exemplos na minha vida, que
incentivaram, apoiaram e conduziram
minha formação profissional.

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo e a Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo.

Ao meu orientador **Prof. Dr. Carlos Alberto Longui**, pelo seu incentivo e compreensão à realização desse trabalho.

Ao **Prof. Dr. Júlio Toporovski**, por seu exemplo diário de dedicação à prática e ensino da medicina.

À **Prof. Mylene N. Rocha**, pela cooperação e participação ativa na realização deste trabalho.

À **Prof. Dra. Edi L. Sartorato**, pela colaboração no ensino de conceitos fundamentais a realização desse trabalho.

Sumário

| | |
|--|------------------|
| <u>LISTA DE ABREVIATURAS.....</u> | <u>8</u> |
| <u>1. INTRODUÇÃO.....</u> | <u>9</u> |
| 1.1. GLICOGENOSES..... | 11 |
| 1.2. GLICOGENOSE TIPO I..... | 14 |
| 1.3. GLICOGENOSE TIPO I A..... | 15 |
| 1.3.1. DEFINIÇÃO:..... | 15 |
| 1.3.2. EPIDEMIOLOGIA:..... | 15 |
| 1.3.3. GENÉTICA..... | 16 |
| 1.3.4. COMPLEXO ENZIMÁTICO GLICOSE-6-FOSFATASE:..... | 18 |
| 1.3.5. FISIOPATOLOGIA:..... | 20 |
| 1.3.6. QUADRO CLÍNICO:..... | 22 |
| 1.3.7. DIAGNÓSTICO..... | 25 |
| 1.3.8. TRATAMENTO..... | 30 |
| 1.3.9. PROGNÓSTICO..... | 32 |
| <u>2. OBJETIVO.....</u> | <u>34</u> |
| 2.1. OBJETIVO GERAL..... | 34 |
| 2.2. OBJETIVO ESPECÍFICO..... | 34 |
| <u>3. MATERIAIS E MÉTODOS:.....</u> | <u>35</u> |
| 3.1. CASUÍSTICA..... | 35 |
| 3.2. MÉTODOS..... | 36 |
| 3.2.1. COLETA DE MATERIAL..... | 36 |
| 3.2.2. EXTRAÇÃO DE DNA..... | 36 |
| 3.2.3. AMPLIFICAÇÃO ATRAVÉS DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE DOS 5 EXONS QUE COMPÕEM O GENE G6PC..... | 37 |
| 3.2.4. PURIFICAÇÃO DO PRODUTO DE PCR..... | 39 |
| 3.2.5. REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO..... | 39 |
| 3.2.6. PURIFICAÇÃO DA REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO PARA BIGDYE (3,1):..... | 40 |
| 3.2.7. SEQUENCIAMENTO AUTOMÁTICO..... | 40 |
| 3.2.8. ANÁLISE DO SEQUENCIAMENTO..... | 41 |
| 3.2.9. AVALIAÇÃO DAS MUTAÇÕES MAIS FREQUENTES DO GENE G6PC POR MEIO DE ENZIMA DE RESTRIÇÃO (RFLP-RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM)..... | 41 |
| <u>4. RESULTADOS.....</u> | <u>45</u> |
| 4.1. ANÁLISE DAS MUTAÇÕES PELA TÉCNICA DE SEQUENCIAMENTO AUTOMÁTICO..... | 45 |
| 4.2. ANÁLISE DAS MUTAÇÕES R83C E Q347X PELA TÉCNICA DE RFLP..... | 48 |
| <u>5. DISCUSSÃO.....</u> | <u>51</u> |
| <u>6. CONCLUSÕES.....</u> | <u>55</u> |

| | | |
|-------------------|---|------------------|
| <u>7.</u> | <u>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:</u> | <u>56</u> |
| <u>8.</u> | <u>ANEXOS.....</u> | <u>65</u> |
| <u>9.</u> | <u>RESUMO.....</u> | <u>75</u> |
| <u>10.</u> | <u>ABSTRACT.....</u> | <u>76</u> |
| <u>11.</u> | <u>APÊNDICE.....</u> | <u>77</u> |

LISTA DE ABREVIATURAS

EIM – erros inatos do metabolismo

GLUT 2 – transportador facilitado de glicose 2

UDP – uridina difosfato

G6Pase –enzima glicose-6-fosfatase.

G-6-P – glicose-6-fosfato

G-1-P – glicose-1-fosfato

Pi – fósforo inorgânico

G6PC –sub-unidade catalítica da enzima glicose-6-fosfatase.

RE – retículo endoplasmático

RNA_m – ácido ribonucléico - mensageiro

Kb – mil pares de base

bp – pares de base

KDa – mil Daltons

ADP – adenosina difosfato

ATP - adenosina trifosfato

CoA – coenzima A

PCCS – amido pré-cozido

UCCS – amido cru

CNGDF – alimentação noturna via sonda nasogástrica

DNA – ácido desoxirribonucléico

cDNA – região codificadora de proteína do ácido desoxirribonucléico

1. INTRODUÇÃO

Atualmente são conhecidas cerca de 500 doenças relacionadas aos erros inatos do metabolismo (EIM). A incidência isolada de cada uma dessas doenças na população é baixa. Entretanto, o conjunto destes EIM apresenta uma incidência acumulada de 1 para cada 500 nascidos vivos. ⁽¹⁾

Observa-se uma “epidemia” de erros inatos nos grandes centros. Este aumento da incidência reflete na verdade o maior entendimento da fisiopatologia, uma sistemática elaboração de novos testes diagnósticos e a emergência de profissionais da saúde com treinamento para reconhecer e investigar estas enfermidades.

Deve-se notar a complexidade envolvida no diagnóstico e seguimento deste grupo heterogêneo de doentes, pois cada defeito enzimático associa-se a características únicas e peculiares.

Na faixa etária pediátrica, os EIM constituem diagnóstico diferencial obrigatórios na investigação de hipoglicemia, sendo sugestivo os seguintes achados:

- Hipoglicemia desencadeada por certos componentes da dieta: galactosemia, doença da urina de xarope de bordo, defeitos da gliconeogênese, intolerância hereditária à frutose.
- Hepatomegalia: glicogenoses, e defeitos da gliconeogênese.
- Miopatias e cardiomiopatias: defeitos da β -oxidação, glicogenose tipo IIIa.

Os principais EIM relacionados à manifestação de hipoglicemia são os seguintes (TABELA 1) ⁽²⁾:

Tabela-1 Erros Inatos do Metabolismo Associados à Hipoglicemia

- **Com Hepatomegalia**
 - **Com insuficiência hepática, podendo evoluir para fibrose ou cirrose:** Tirosinemia tipo I, Hemocromatose Neonatal, Distúrbios da Cadeia Respiratória, Galactosemia (GALT, GALE), Glicogenose (tipo III, IV, IXc), Deficiência da S-adenosilhomocisteína hidrolase (rara), Insuficiência hepática grave de outras etiologias, Intolerância Hereditária à Frutose (após oferta de frutose).
 - **Sem insuficiência hepática:** Glicogenose tipo I. Deficiência da Frutose 1, 6 Difosfatase (hepatomegalia moderada), Deficiência da Fosfoenolpiruvato Carboxiquinase (PEPCK), Síndrome de Fancone-Bickel (Glicogenose XI).
 - **Com fibrose hepática:** Defeito Congênito da Glicolisação (CDG).
- **Sem Hepatomegalia Persistente**
 - **Com cetoacidose:** Acidúrias Orgânicas, Doença da Urina em Xarope de Bordo, Defeitos da Cetólise, Deficiência de Glicerol Quinase, Distúrbios da Cadeia Respiratória, Deficiência da Desidrogenase da Acil-CoA de Cadeia Média (MCAD), Deficiência da Desidrogenase da 3-Hidroxi-Acil-CoA de Cadeia Curta (SCHAD), Deficiência da Frutose 1,6 Difosfatase, Glicogenose 0.
 - **Acidose Sem Cetose:** Deficiência HMG-CoA Liase (frequente), Deficiência da HMG-CoA Sintase (rara), Distúrbios da Oxidação dos Ácidos Graxos (frequente), Síndrome de Reye Idiopática.
 - **Cetose Sem Acidose:** Deficiência da Desidrogenase da Acil-CoA de Cadeia Média(MCAD), Deficiência da Desidrogenase da 3-Hidroxi-Acil-Coa de Cadeia Curta (SCHAD), Defeitos da Cetólise.
 - **Sem Cetose e Acidose:** Distúrbios da Oxidação dos Ácidos Graxos (frequente), Deficiência da HMG-CoA Liase (rara), Deficiência da HMG-CoA Sintase (rara), Deficiência da Frutose 1,6 Difosfatase (rara), Defeito Congênito da Glicosilação (CDG).

GALT: deficiência da galactose 1 fosfato uridil transferase “galactosemia clássica”;GALE: deficiência da uridil difosfato galactose epimerase;HMG-CoA sintase: 3-hidróxi-3-metilglutaril-CoA sintase;HMG-CoA liase: 3-hidróxi-3-metilglutaril-CoA liase; CDG: defeitos congênitos da glicosilação -Defeitos da síntese do N-Glican.

(modificado de SAUDUBRAY, J. M; CHARPENTIER, C. - Clinical phenotypes: diagnosis/algorithms. **In:** Scriver, CR; Beaudet, AL; Sly, W S; Valle, D. The Metabolic & Molecular Bases of Inherited Disease. McGraw-Hill, 2001, pp 1327- 1403).

1.1. Glicogenoses

Glicogenoses compreendem um grupo de doenças hereditárias que interferem no metabolismo do glicogênio. O glicogênio é um polissacarídeo de armazenamento do organismo animal, freqüentemente chamado de amido animal (FIGURA I). É formado a partir de um molde protéico, a glicogenina, pela adição de cadeias com 11 a 18 resíduos de α -D-glicopiranosose (com ligações glicosídicas α [1 \rightarrow 4]) e ramificações por meio de ligações glicosídicas α [1 \rightarrow 6].

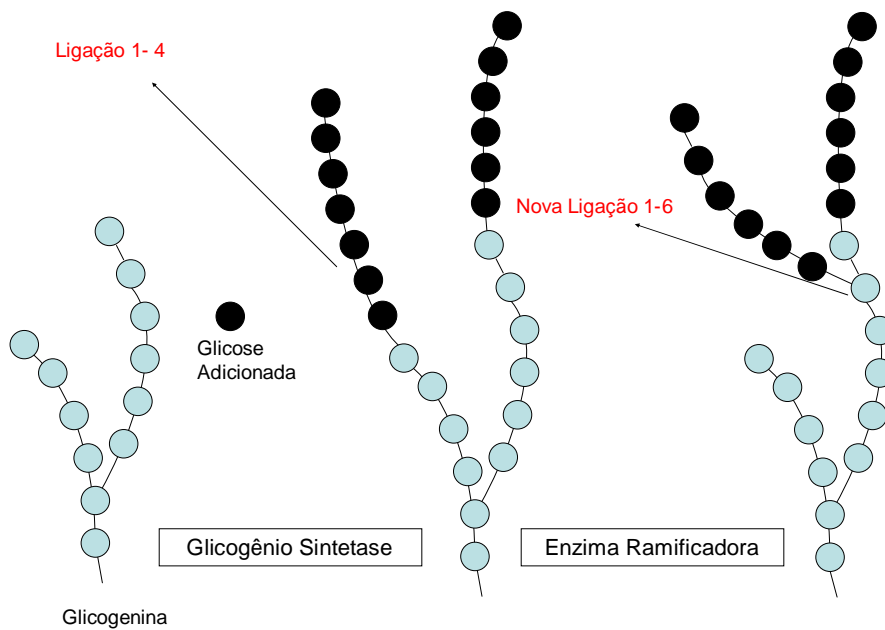


FIGURA I - Representação esquemática da síntese do glicogênio

Todas as proteínas envolvidas na síntese, degradação ou regulação do metabolismo do glicogênio, podem, quando alteradas, causar glicogenoses. O glicogênio encontra-se nessas circunstâncias alterado em sua estrutura, quantidade, ou em ambas.

A primeira descrição de um defeito na mobilização de glicogênio ocorreu em 1928 por Snappes and Van Creveld. ⁽³⁾

Diversas formas da doença foram descritas e classificadas numericamente respeitando a ordem cronológica que as alterações enzimáticas foram identificadas (TABELA 2)

TABELA 2 – Tipos de Glicogenose

| Nome | Enzima Afetada | Órgão Principal |
|-------------|---|----------------------------------|
| Tipo 0 | Glicogenio sintetase | Fígado |
| Tipo Ia | Glicose 6 fosfatase | Fígado, rim e intestino |
| Tipo Ib | Microssomal glucose-6-phosphate Translocase | Fígado |
| Tipo Ic | Microssomal Pi transportador | Fígado |
| Tipo II | Lisossomal α -1,4-glicosidase | M.esquelético e cardíaco |
| Tipo IIIa | Enzima desramificadora muscular e hepática | Fígado, M.esquelético e cardíaco |
| Tipo IIIb | Enzima desramificadora hepática | Fígado, M.esquelético e cardíaco |
| Tipo IV | Enzima ramificadora | Fígado e músculo |
| Tipo V | Fosforilase muscular | Músculo |
| Tipo VI | Fosforilase hepática | Fígado |
| Tipo VII | Fosfofrutoquinase eritrocitária e muscular | Músculo e eritrócitos |
| TipoVIb, | Fosforilase quinase | Leucócitos, figado e músculo |
| VIII ou IX | | |
| Tipo XI | Glut 2 | Fígado e rim |

A frequência acumulada das glicogenoses é de aproximadamente 1: 20.000 nascidos vivos, sendo os tipos I, II, III, VI e IX os mais comuns, representando 90% de todos os casos (4).

As glicogenoses relacionadas ao achado de hipoglicemia são as dos tipos: 0, I, III, IV, VI, IX, relacionadas ao acometimento hepático, fundamental para a homeostase glicêmica (FIGURA II).

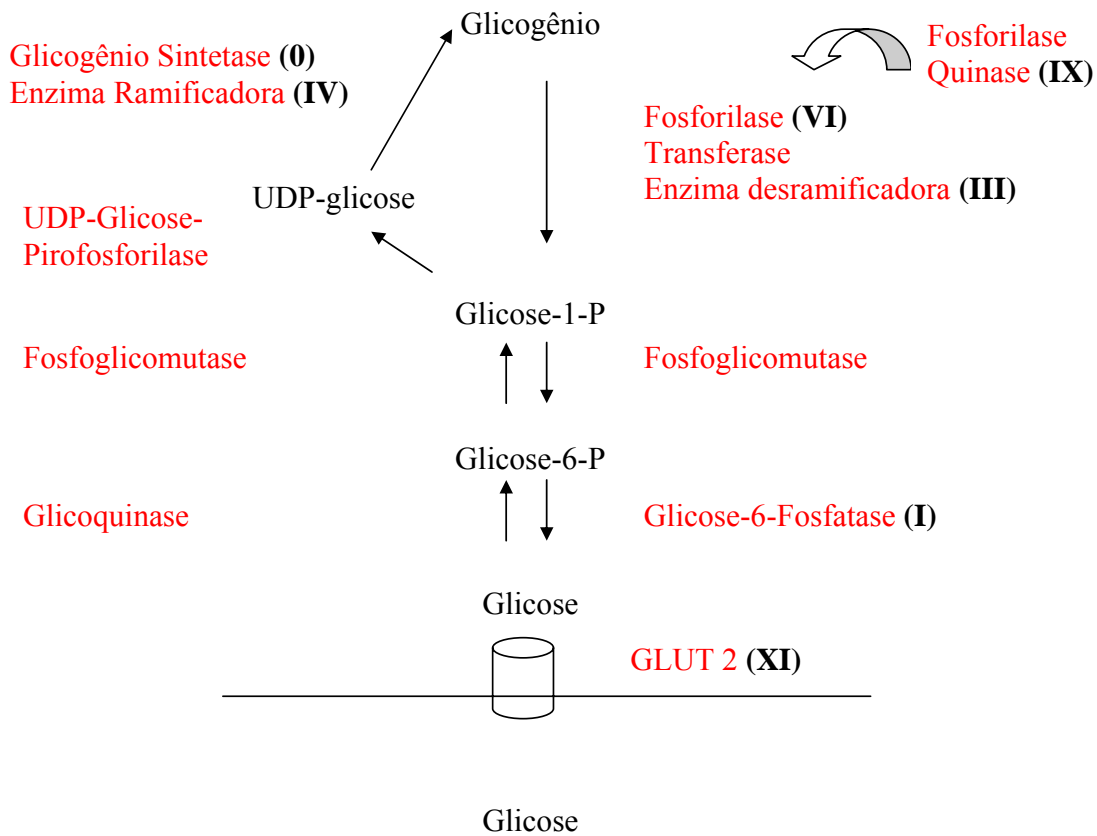


FIGURA II- Enzimas envolvidas na glicogênese e glicogenólise e implicadas nas glicogenoses com acometimento hepático.

1.2. Glicogenose tipo I

Em 1929 Edgar Otto Conrad von Gierke, patologista alemão, publicou a primeira descrição de glicogenose tipo I, inicialmente chamada de “hepatomegaly glicogênica”⁽⁵⁾.

Em 1952, Cori e Cori, demonstraram que a doença era causada pela deficiência da enzima glicose-6-fosfatase ⁽⁶⁾ (FIGURA III). A descrição de alguns casos com quadro clínico idêntico à glicogenose tipo I, mas com atividade preservada da glicose-6-fosfatase, levou à criação, dos termos: Ib para classificar esses pacientes e Ia para classificar àqueles com atividade deficiente da glicose-6-fosfatase (G6Pase) ⁽⁷⁾.

Posteriormente demonstrou-se que um defeito no transportador de membrana microsomal da glicose-6-fosfato (G-6-P translocase) era a causa do tipo Ib ⁽⁸⁾ (FIGURA III).

Em 1983 um terceiro tipo de glicogenose tipo I foi descrito, sendo atribuído a este tipo um defeito no transportador de fosfato ⁽⁹⁾ (FIGURA III).

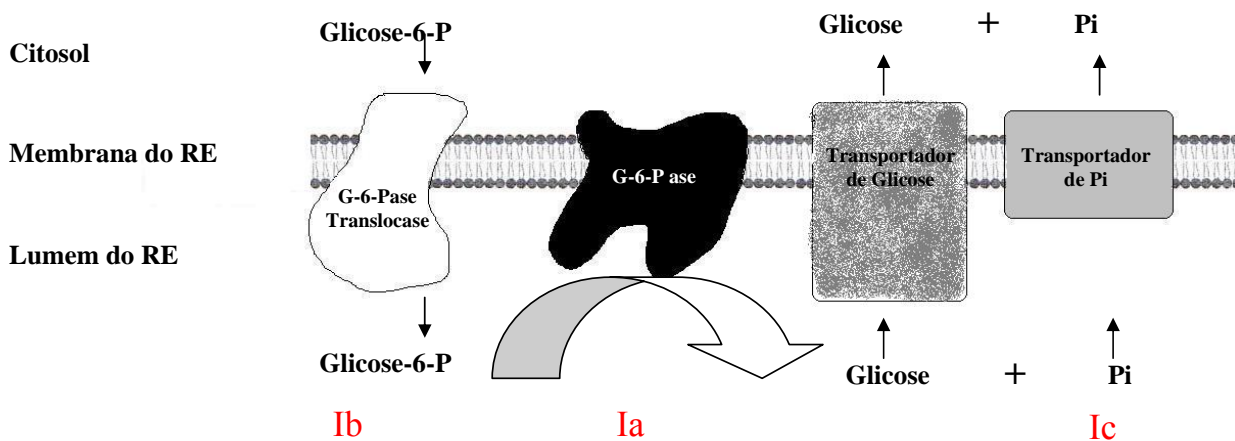


FIGURA III – Complexo da Glicose-6-Fosfatase. A glicose-6-fosfato é transportada pela enzima G6Pase translocase para o lúmen do Retículo Endoplasmático (RE). Apenas no lúmen a glicose-6-fosfato é catalisada pela enzima G6Pase, sendo desfosfatada. (modificado de CHEN, Y. T. – Glycogen Storage Diseases. **In:** Scriver, C. R.; Beaudet A. L.; et al.: **The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease**, 8th ed, vol 1. New York McGraw-Hill, 2001; 1521-1551.) ⁽⁴⁾

1.3. Glicogenose tipo I a

1.3.1. Definição:

A glicogenose do tipo Ia é resultado do defeito da sub-unidade catalítica do complexo enzimático da Glicose-6-Fosfatase ⁽⁶⁾.

Durante o jejum, a glicogenólise e a gliconeogênese, principais responsáveis pela homeostase glicêmica, produzem glicose-6-fosfato, que é hidrolizada no fígado para glicose e fosfato. A hidrólise da glicose-6-fosfato constitui a etapa final da produção de glicose, pois enquanto a mesma estiver fosfatada, é incapaz de atravessar a membrana celular do hepatócito para alcançar outros tecidos.

1.3.2. Epidemiologia:

Glicogenose tipo I é uma doença com incidência estimada de 1: 100.000-1:300.000 nascidos vivos ^(10, 11). Em populações de judeus Ashkenazi a incidência da doença pode ser muito mais alta, sendo a frequência estimada de portadores na população de 1:65 indivíduos ⁽¹²⁾.

A frequência relativa de glicogenose tipo Ia e glicogenose tipo Ib é da ordem de 5-10:1 ⁽¹³⁾. Um recente estudo multicêntrico realizado na Europa apresentou 57 pacientes (19%) com glicogenose tipo Ib e 231 pacientes (81%) com glicogenose tipo Ia. ⁽¹⁴⁾.

Acomete com igual frequência pessoas do sexo masculino e feminino ⁽¹⁵⁾.

A doença é descrita em caucasianos, hispânicos, orientais (japoneses e chineses), judeus e turcos ⁽¹⁶⁾.

1.3.3. Genética

A glicogenose tipo Ia (OMIM - 232200) ⁽¹⁷⁾ é uma doença autossômica recessiva ⁽¹⁰⁾, determinada por alteração no gene G6PC (HGNC: 4056) ⁽¹⁸⁾, localizado no cromossomo 17 locus q21 ⁽¹⁷⁾, que codifica a sub-unidade catalítica do complexo enzimático Glicose-6-Fosfatase ⁽¹⁹⁾.

O gene G6PC (FIGURA IV) apresenta uma estrutura com 12,6 kb, divididos em 5 exons ⁽²⁰⁾ com 309, 110, 106, 116 e 2455 pares de bases, respectivamente ⁽²¹⁾. No exon V somente 509 pares de bases são codificadores ⁽¹⁹⁾.

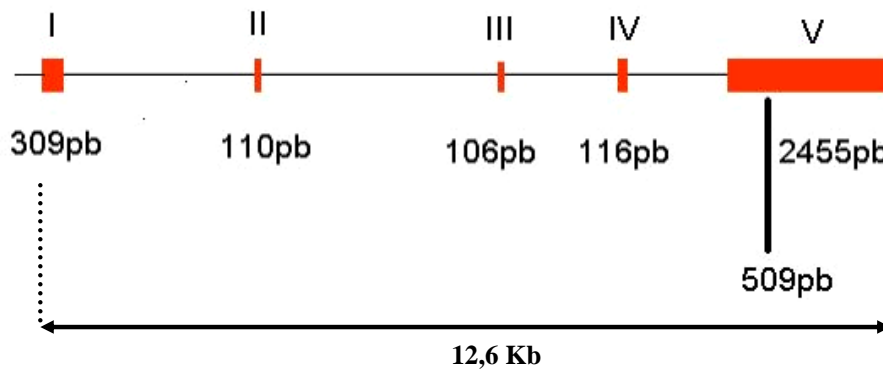


FIGURA IV - Representação da Estrutura do Gene da G6PC (modificado de GeneAtlas: Gene Database [on line]. G6PC [citado 11 jan 2006]. Disponível em: <http://www.dsi.univ-paris5.fr/genatlas/fiche.php?symbol=G6PC>)

O gene G6PC codifica um RNAm com 3096 pares de bases, sendo que 1074 pares de bases representa a região codificadora ⁽²¹⁾. A proteína resultante, apresenta 357 aminoácidos.

Até o momento, 85 mutações diferentes foram descritas nesse gene ⁽²²⁾ (TABELA 3).

TABELA 3: Frequência dos Tipos de Mutação do Gene G6PC

| Tipo de Mutação | Número de mutações |
|--------------------------------|--------------------|
| Sentido incorreto/ Sem sentido | 63 |
| Splicing | 4 |
| Reguladora | 0 |
| Pequenas deleções | 11 |
| Pequenas inserções | 4 |
| Pequenas deleção/inserção | 3 |
| Grandes deleções | 0 |
| Grandes inserções | 0 |
| Rearranjos complexos | 0 |
| Variações repetidas | 0 |
| TOTAL | 85 |

(Modificado de HUMAN GENE MUTATION DATABASE [on line]. G6PC. [citado 13 out 2006]. Disponível em : <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/gene.php?gene=G6PC>)

As mutações mais frequentemente observadas nos pacientes com glicogenose tipo Ia são: R83C (26,7%), 158 delC (20%) e Q347X (11,7%), localizadas respectivamente nos exons 2, 1 e 5 ⁽²³⁾.

Em caucasianos observa-se que as mutações mais frequentes são: R83C (29,9%) e Q347X (32%) ⁽²⁴⁾.

1.3.4. Complexo enzimático Glicose-6-Fosfatase:

O complexo enzimático Glicose-6-Fosfatase é uma proteína integral da membrana do retículo endoplasmático ⁽²⁵⁾, que catalisa a hidrólise da glicose-6-fosfato para glicose e fosfato (FIGURA V). Essa reação faz parte da glicogenólise, que é o conjunto de reações que catalisam o glicogênio, liberando a glicose para alcançar outros tecidos.

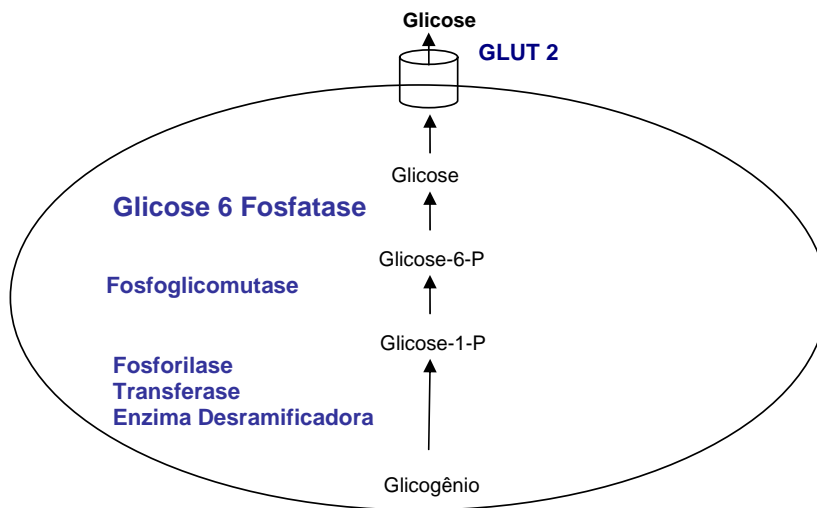


FIGURA V – Enzimas responsáveis pela glicogenólise

O complexo enzimático G6Pase é constituído por duas sub-unidades (FIGURA III):

- Sub-unidade catalítica (G6PC - HGNC: 4056) ⁽¹⁸⁾
- Sub unidade translocase (SLC37A4 - HGNC: 4061) ⁽²⁶⁾

G6Pase sub-unidade catalítica é uma glicoproteína de 36,5 KDa, constituída por 357 aminoácidos, ⁽¹⁹⁾ ancorada ao retículo endoplasmático por 9 hélices trans-membrana com os terminais amino e carboxi, voltados para a face luminal e citoplasmática respectivamente (FIGURAVI) ⁽²⁵⁾.

Seqüenciamentos sugerem que as G6Pases, fosfatases lipídicas, fosfatases ácidas e haloperoxidasas de vanádio conservam uma região idêntica, que se apresenta como uma assinatura de fosfatases. Na G6Pase, isso ocorre entre os resíduos 76 e 180. Baseado na estrutura cristalizada de cloroperoxidasas contendo vanádio foi inferido que os aminoácidos que participam diretamente da reação de catálise, ou seja, constituem o sítio ativo da enzima, são os: K76, R83, H119, R170 e H176 ⁽²⁴⁾.

A localização dos aminoácidos R83, H119, R170 e H176 determina que o sítio ativo da enzima esteja encerrado na face luminal da enzima. Assim, para que a reação de catálise ocorra, é necessário que o substrato (glicose-6-fosfato) seja transportado para o interior do retículo endoplasmático ⁽²⁴⁾. Esse transporte é realizado pela G-6-Pase translocase, parte igualmente fundamental do complexo enzimático da Glicose-6-Fosfatase ⁽²⁷⁾.

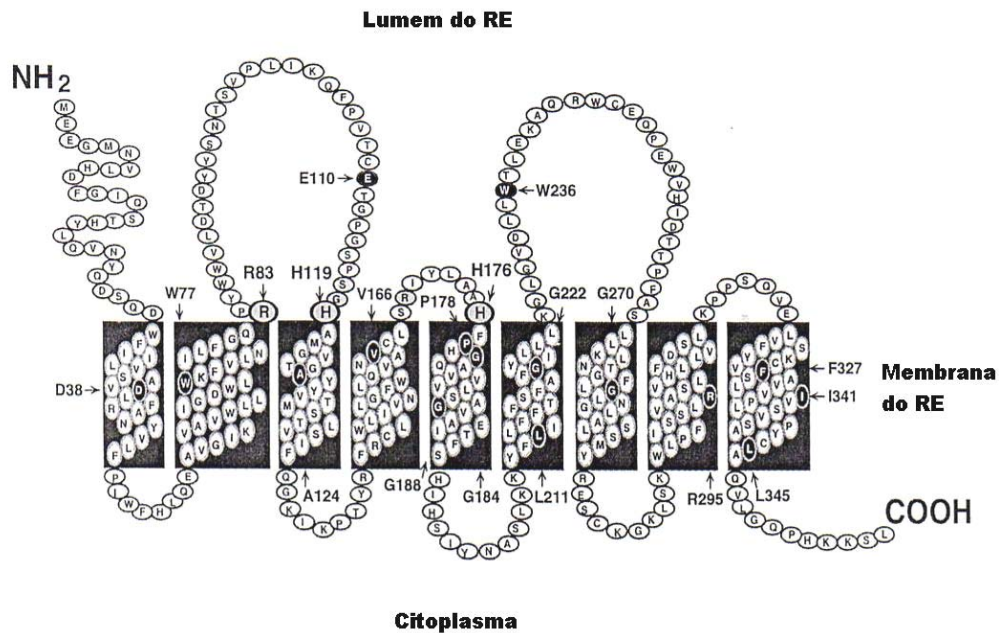


FIGURA VI – Estrutura proteica da G6Pase exibindo a sequência de aminoácidos e algumas mutações na face luminal e na região transmembrana. (modificado de Pan, C. J.; Kei, K.; Annabi, B.; et al. – Transmembrane topology of glucose-6-phosphatase. *J Biol Chem*, 273: 6144, 1998.) ⁽²⁵⁾

Nenhuma mutação que codifica aminoácidos das alças citoplasmáticas foi identificada. Observa-se que mutações de bases que codificam aminoácidos localizados nas hélices transmembrana causam maior redução da atividade enzimática do que àquelas relativas a aminoácidos localizados nas alças luminais ⁽²²⁾. Assim, especula-se que a integridade estrutural das hélices transmembrana seja fundamental para o funcionamento da enzima.

1.3.5. Fisiopatologia:

Nos períodos de jejum, a glicose armazenada sob a forma de glicogênio, ou aquela produzida a partir de substratos não carboidratos, deve sofrer catálise.

Mutações no gene G6PC causam disfunção da Glicose-6-Fosfatase em sua subunidade catalítica ⁽¹⁹⁾, comprometendo o metabolismo normal, pois a reação constitui a etapa final dessas reações de catálise: glicogenólise e gliconeogênese.

Como consequência os indivíduos com glicogenose tipo Ia são incapazes de manter glicemia normal nos períodos de jejum, ficando suscetíveis à hipoglicemia (FIGURA VII).

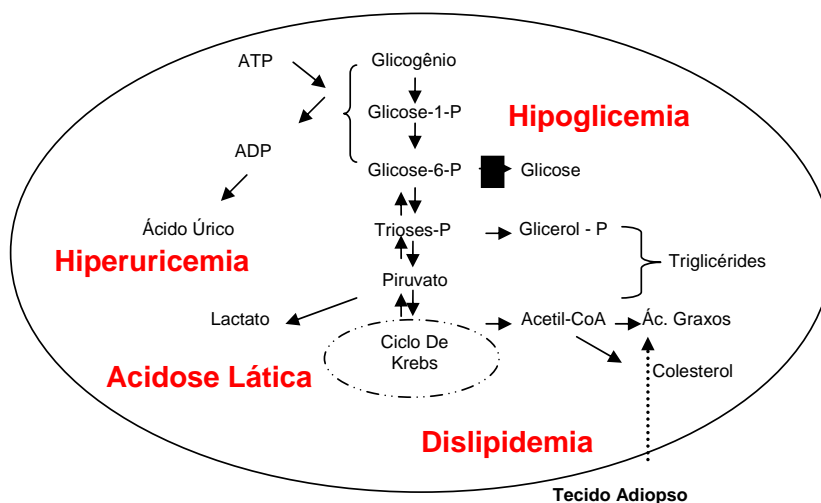


FIGURA VII – Fisiopatologia bioquímica da glicogenose tipo I (modificado de CHEN, Y. T. – Glycogen Storage Diseases. In: Scriver, C. R.; Beaudet A. L.; et al.: **The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease**, 8th ed, vol 1. New York McGraw-Hill, 2001; 1521-1551.) ⁽⁴⁾.

O acúmulo de glicose-6-fosfato no meio intracelular, leva a um aumento da reação glicolítica ⁽²⁹⁾, com produção abundante de acetil-CoA e glicerol, que são os substratos para a produção de triglicérides e colesterol, resultando em aumento da lipogênese ⁽²⁸⁾ (FIGURA VII)

A lipólise das lipoproteínas circulantes é defeituosa nos pacientes com glicogenose tipo I ^(30,31). A diminuição da atividade da lipoproteína lipase ⁽³⁰⁾ e a diminuição da captação de LDL observada em pacientes com glicogenose tipo Ia ⁽³²⁾ levam à diminuição do clareamento plasmático de triglicérides e colesterol respectivamente. Observa-se ainda que nos pacientes com glicogenose tipo Ia há aumento dos níveis séricos de ácidos graxos livres, provavelmente, conseqüente à lipólise do tecido adiposo regulada pela atividade da lipase hormônio sensível em resposta aos baixos níveis de insulina ⁽²⁸⁾.

Assim, o aumento da síntese e a diminuição dos mecanismos de clareamento, poderiam explicar a dislipidemia.

Especula-se ainda, que o aumento da produção de piruvato e conseqüente acetil-CoA, leve a um aumento da produção de malonil-CoA, que atua inibindo a carnitina palmitoil transferase I, enzima fundamental à reação da beta-oxidação ⁽³³⁾. Assim, além do aumento da produção de lipídeos, ocorre a diminuição de sua utilização.

O aumento da reação glicolítica leva ainda à produção abundante de piruvato, convertido em ácido láctico pela enzima desidrogenase láctica, determinando acidose láctica (FIGURA VII).

No hepatócito, o acúmulo de substâncias fosfatadas participantes da reação glicolítica, leva à depleção do fosfato intracelular e um conseqüente aumento da degradação de nucleotídeos de adenina, e produção de ácido úrico (FIGURA VII). O ácido láctico produzido em excesso compete com o ácido úrico na excreção renal. Assim o aumento de produção e a diminuição de excreção resultam em hiperuricemia ⁽⁴⁾.

1.3.6. Quadro Clínico:

O quadro clínico dos pacientes com Glicogenose tipo Ia é inerente às alterações fisiopatológicas, podendo se apresentar agudamente sob a forma de crises já nos primeiros meses de vida, ou como complicações das alterações bioquímicas crônicas.

A idade média para apresentação de sinais e sintomas em pacientes com glicogenose tipo Ia é de 6 meses, sendo que 90% dos pacientes apresentam alguma manifestação antes de completar 1 ano de vida ⁽¹⁴⁾.

Recentemente, um grupo de 288 pacientes com glicogenose tipo Ia foi avaliado ⁽¹⁴⁾ e as características dominantes apresentadas pelos pacientes foram: abdômen protuberante (83% dos pacientes), sintomas de descompensação metabólica aguda (71%), falha de crescimento (25%), hipotonia (13%), atraso do desenvolvimento neuropsicomotor (7%) e infecções recorrentes (3%). Fascies semelhante a uma boneca é referida como característica da doença ^{(4) (13)}. O abdome protuberante é conseqüente ao aumento do fígado e dos rins ⁽³³⁾. Os sintomas de descompensação metabólica aguda são relacionados à hipoglicemia e acidose láctica.

Hipoglicemia, uma das características mais marcantes da doença, ocorre nos períodos de jejum, quando se faz necessário o uso de glicogênio para manutenção da homeostase glicêmica, concomitante à acidose láctica. Em lactentes isso ocorre quando o intervalo entre as mamadas é mais longo ⁽³⁵⁾.

A descompensação metabólica aguda pode manifestar-se através de: convulsões, sudorese profusa, taquipnéia, perda ou rebaixamento do nível de consciência, crises de apnéia ou de cianose e até mesmo óbito ^{(1) (13) (14)}.

Observou-se que em 65% das crises metabólicas agudas o paciente apresentou convulsões e em 15% sudorese e palidez ⁽¹⁴⁾.

A dislipidemia é observada através do aparecimento de xantomas e máculas amareladas na conjuntiva. Pode ser detectada, durante uma coleta de sangue, pela presença de soro lipêmico, o que pode interferir em outras mensurações bioquímicas ^{(10) (13) (35)}. Complicações relativas à dislipidemia não são freqüentes, porém pancreatites e coleditiase podem ocorrer ^{(14) (35)}.

A possibilidade de aterosclerose precoce foi avaliada devido à presença de dislipidemia e microalbuminúria, marcas quase constantes da glicogenose tipo Ia ⁽³⁶⁾. Entretanto, não se detecta com freqüência a aterosclerose nesses pacientes ^{(37) (38)}.

A hiperuricemia pode levar a complicações em 14% dos pacientes ⁽¹⁴⁾. A doença gotosa pode ser observada na puberdade ^{(4) (39)}, porém complicações renais como o aparecimento de calcificações e litíase renal podem ocorrer precocemente, já em lactentes jovens ⁽¹⁴⁾.

Outra característica da doença é a tendência a sangramentos ou epistaxe presente em cerca de 23% dos pacientes com glicogenose tipo I ⁽¹⁴⁾, possivelmente resultante de disfunção da agregação plaquetária ^{(4) (35)}.

Anemia é comum em pacientes com glicogenose tipo I ⁽¹²⁾, estando associada a um pobre controle metabólico ⁽⁴⁰⁾. Um estudo recente observou 20% de anemia em pacientes com glicogenose tipo Ia ⁽¹⁴⁾. A anemia apresenta-se como microcítica e relacionada à deficiência de ferro ⁽¹²⁾. Anemia resistente à terapia com ferro foi relacionada à presença de adenomas hepáticos, que uma vez ressecados determinam a rápida correção da mesma ⁽⁴¹⁾.

Crescimento deficiente com estatura abaixo de 2 desvios-padrão da estatura média para a idade foi observada em 16% dos pacientes com glicogenose tipo Ia e idade entre 2 e 5 anos e em 39% entre 5 e 10 anos.

Um estudo observou que os pacientes com glicogenose tipo Ia mesmo durante o tratamento apresentam altura significativamente menor que suas estaturas alvo ⁽⁴⁰⁾. Observou-

se $-1,29 \pm 0,59$ desvios-padrão na altura de crianças entre 7-14 anos em tratamento com amido cru e $-1,24 \pm 0,63$ desvios-padrão para as tratadas com infusão noturna contínua de glicose, não havendo diferença significativa entre os dois grupos ⁽⁴²⁾. A estatura final foi alcançada em uma idade mediana de 21 anos para os pacientes do sexo masculino e 20 anos para as do sexo feminino. Foi observado atraso de desenvolvimento puberal em 56% dos pacientes com glicogenose tipo Ia ⁽¹⁴⁾. Um controle metabólico adequado pode melhorar o crescimento desses pacientes ⁽⁴³⁾.

Uma complicação freqüente em pacientes com glicogenose tipo Ia é a formação de adenomas hepáticos ^{(36) (44) (45)}. O aparecimento dessa complicação já foi descrito em pacientes de 2 a 54 anos de idade, não obstante, é muito mais freqüente a partir da segunda década de vida ^{(14) (44) (45)}. Dependendo da população estudada, observa-se uma prevalência que varia entre 22% e 75% ⁽⁴⁵⁾.

Os adenomas podem ser solitários ou múltiplos e evoluir com complicações hemorrágicas ou transformações malignas. A regressão desses tumores foi observada em alguns pacientes após a instituição do tratamento dietético ⁽⁴⁶⁾.

Complicações renais também são freqüentes em pacientes com glicogenose tipo Ia ⁽⁴⁾ ^{(14) (36) (47) (48) (49)}. Nefromegalia secundária ao acúmulo de glicogênio no tecido renal é muito comum ^{(4) (48) (49)}. Hiperfiltração, geralmente, é a primeira manifestação de doença renal ^{(4) (38)}. Aos 16 anos, cerca de 40% dos pacientes já apresentam microalbuminúria e 8% proteinúria. Aos 24 anos, cerca de 80% têm microalbuminúria e 20% proteinúria ⁽¹⁴⁾. Hipertensão arterial foi observada em 6% dos pacientes com idade mediana de 17 anos ⁽¹⁴⁾. Hipocitratúria foi observada em 100 % dos pacientes em 2 estudos independentes com pacientes cujas idades variaram de 2 à 24 anos e 2 à 28 anos ^{(47) (50)}. Hipercalcúria foi observada em 45% dos pacientes ⁽⁴⁷⁾. A alta prevalência da hipocitratúria às vezes associada a hipercalcúria explica a frequente ocorrência de litíase ou nefrocalcinose nesses pacientes ^{(36) (47) (48) (50)}. Outras

complicações observadas são: tubulopatias, amiloidose renal, nefropatia secundária à hiperuricemia e insuficiência renal crônica com a progressão da doença renal ^{(4) (47) (48) (49)}.

Estudos comparando a densidade mineral óssea de pacientes com glicogenose tipo Ia e grupos controles, observaram significativa redução no primeiro grupo ^{(51) (52) (53)}. A osteopenia, provavelmente ocorre secundária à acidose metabólica crônica e hipercalciúria ⁽⁴⁴⁾ e está associada à redução da força muscular e pobre controle metabólico ⁽⁵⁴⁾. Fraturas freqüentes foram observadas em pacientes adultos ⁽³⁶⁾, entretanto, em estudo onde a idade mediana foi de 10 anos, as complicações secundárias à osteopenia não foram freqüentes ⁽¹⁴⁾.

Outras características como a redução da capacidade de exercício ⁽⁵⁵⁾, lesão cerebral conseqüente à hipoglicemia crônica grave ⁽⁵⁶⁾, hipertensão pulmonar grave secundária a altos níveis de serotonina ^{(57) (58)} e diarreia ⁽⁵⁹⁾, foram observadas em alguns pacientes.

1.3.7. Diagnóstico

O quadro clínico característico permite a suspeita do diagnóstico. Ao exame, geralmente observa-se hepatomegalia e sinais e sintomas que refletem os distúrbios bioquímicos relativos à hipoglicemia e acidose metabólica.

Um algoritmo de investigação de hipoglicemia normalmente é seguido ⁽²⁾, sendo recomendada a realização de teste de tolerância à glicose, com a determinação de glicemia e lactato ^{(60) (61)}.

Durante o jejum, observa-se aumento do lactato, conforme fisiopatologia anteriormente descrita, que diminui com a carga de glicose. Essa situação é exatamente oposta em pacientes normais em que o lactato diminui durante o jejum e tem uma discreta elevação após a carga de glicose ⁽¹³⁾.

Outro teste funcional que pode ser executado é o teste de jejum com administração de glucagon ou epinefrina. Durante esse teste observa-se que o paciente apresenta hipoglicemia e aumento do lactato durante o jejum e não há aumento da glicemia ou redução do lactato com a administração de glucagon ou epinefrina como ocorreria em uma pessoa sadia. Em um paciente com glicogenose tipo Ia o glucagon ou a epinefrina não elevam significativamente a glicemia e o lactato aumenta ^{(13) (60) (12)}.

Os testes supracitados, não obstante, são apenas parte de uma triagem, na investigação de diagnósticos diferenciais relacionados à hipoglicemia.

O diagnóstico definitivo é realizado através da mensuração da atividade da enzima glicose-6-fosfatase em tecido obtido através de biópsia hepática ^{(4) (6) (12) (13) (62)}.

As características anatomo-patológicas do fragmento obtido através da biópsia hepática são relativamente sensíveis para o diagnóstico da glicogenose tipo I, entretanto, não é específica, especialmente para determinação do subtipo. Assim, embora possa contribuir para o diagnóstico não fornece informação suficiente para sua certeza ⁽⁶³⁾.

À análise anatomo-patológica do fragmento observa-se intenso acúmulo de glicogênio nos hepatócitos, com distribuição relativamente uniforme, exceto nas porções onde é interrompida por vacúolos lipídicos, que são freqüentes e grandes (FIGURAVIII). Os hepatócios apresentam ainda, coloração pálida e membrana plasmática proeminente (FIGURA IX). O aumento dos hepatócitos associado ao concomitante colapso dos sinusóides proporciona ao parênquima uma aparência de mosaico, por obscurecer a arquitetura da placa limitante. A presença de glicogênio no núcleo dos hepatócitos é comumente observada em pessoas normais, mas na glicogenose tipo I chama a atenção a profusão e aspecto grosseiro desse fenômeno, ou seja, a hiperglicogenose nuclear, ^{(63) (64) (65)}.

Observa-se ainda que a presença de fibrose (FIGURA X), inicialmente, considerada ausente nos pacientes com glicogenose tipo I, foi descrita em graus variados, e pode progredir com a idade ⁽⁶⁴⁾ ⁽⁶⁵⁾.

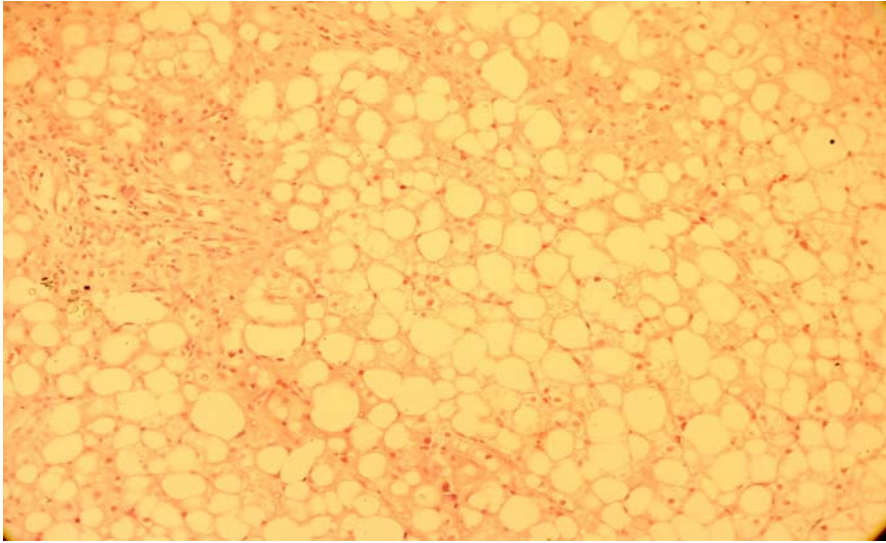


FIGURA VIII – Fragmento de biópsia hepática, mostrando parênquima celular distendido arranjado em uma forma de mosaico e com presença de grandes vacúolos lipídicos.

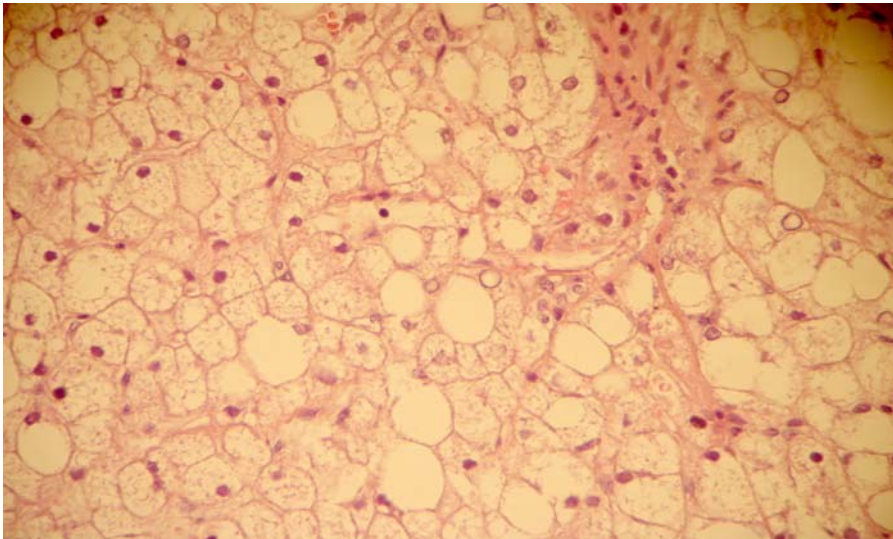


FIGURA IX – Fragmento de biópsia hepática, mostrando intenso acúmulo de glicogênio nos hepatócitos determinando aspecto de palidez.

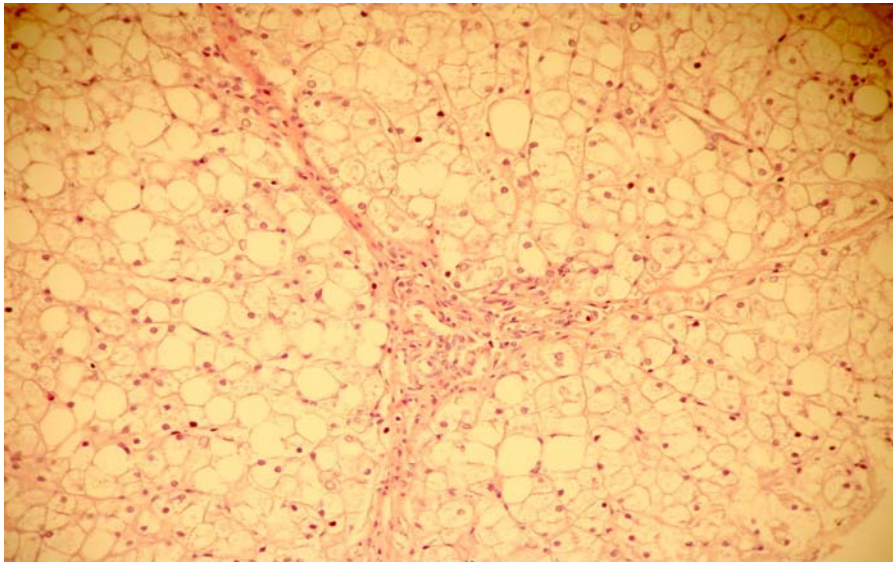
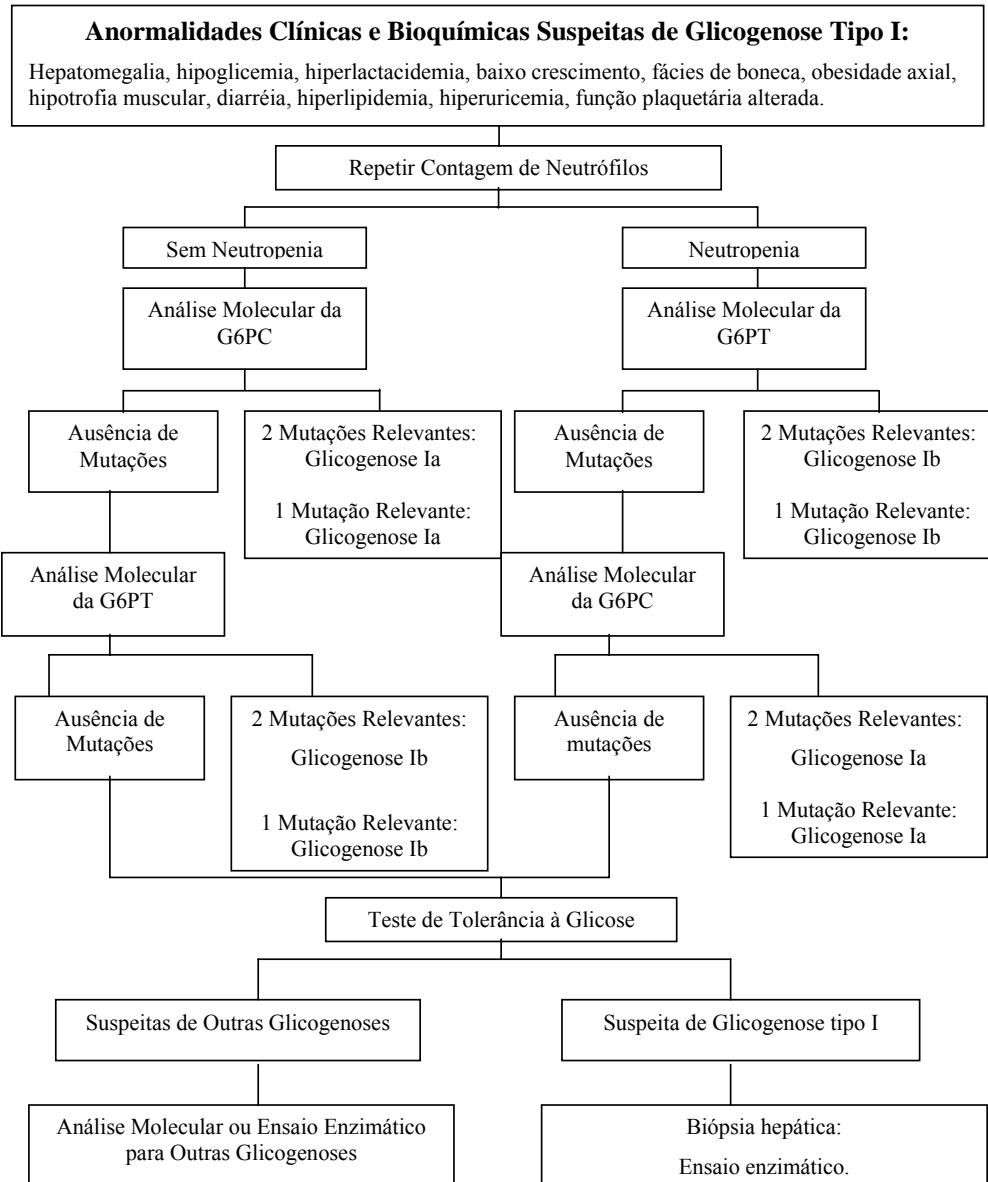


FIGURA X – Fragmento de biópsia hepática, mostrando fibrose no tecido hepático.

Atualmente, com a identificação do gene codificador da enzima G6Pase ⁽¹⁹⁾, o diagnóstico definitivo pode ser realizado através da análise de suas mutações ^{(19) (24) (67) (68) (69) (70) (71) (72) (73) (74) (75) (76) (77) (78) (79) (80) (81) (82) (83) (84) (85) (86) (87) (88) (89) (90) (91) (92) (93)}.

Baseado em vários dos estudos acima, um roteiro para investigação diagnóstica foi proposto por Rake et al (FIGURA XI):



G6PC = Sub-unidade catalítica da Glicose-6-Fosfatase (Glicogenose tipo Ia)

G6PT = Sub-unidade transportadora da Glicose-6-Fosfatase (Glicogenose tipo Ib)

FIGURA XI (Modificado de Rake JP, ten Berge AM, Visser G, Verlind E, Niezen-Koning KE, Buys CH, et. al. Glycogen storage disease type Ia: recent experience with mutation analysis, a summary of mutations reported in the literature and a newly developed diagnostic flow chart)²³

1.3.8. Tratamento

O tratamento da glicogenose tipo Ia visa prover uma fonte dietética de glicose a fim de manter a glicemia acima de 70 mg/dL e o lactato sérico menor que 2,0 mmol/L ^{(4) (12) (13) (37) (97) (98)}. O cálculo para essa quantidade é baseada na taxa de produção basal de glicose em mg/minuto ($0,0014x^3 - 0,214x^2 + 10,411x - 9,084$, sendo x = peso em Kg) ⁽¹²⁾.

Mantendo-se a glicemia acima dessa concentração crítica é possível bloquear a ativação de contrarreguladores da hipoglicemia, evitando-se com isso as descompensações metabólicas agudas ^{(42) (99) (100) (101) (102)}.

Um bom controle da glicemia pode retardar ou até mesmo evitar o aparecimento de complicações tardias da doença ^{(12) (14) (38)}.

Uma variedade de métodos para prover essa fonte de glicose foi tentada, incluindo a infusão parenteral contínua de glicose ^{(100) (103)}, infusão contínua de glicose através do trato gastrointestinal através de sonda gástrica ou gastrostomia ^{(44) (100) (101) (102) (104)}, e o uso de alimentos com liberação lenta de resíduos de glicose (maltodextrina e amido) ^{(4) (12) (13) (37) (42) (44) (98) (99)}.

Uma extensa revisão proveniente de 16 centros hospitalares especializados em doença metabólica em 12 países diferentes, foi publicada em 2002 ⁽¹⁰⁵⁾, constituindo o Estudo Europeu de Glicogenose do Tipo I, que incluiu 231 pacientes com glicogenose tipo Ia com idades que variaram entre 0,4 e 45,4 anos com mediana de 10,4 anos,

As diretrizes do tratamento dietético (TABELA 4), metas do tratamento (TABELA 5), manejo das complicações agudas e crônicas e as normas para seguimento dos pacientes, estabelecendo a frequência das consultas e dos exames laboratoriais e de imagem foram definidos nessa revisão ⁽¹⁰⁵⁾.

TABELA 4 - Dieta Recomendada para Pacientes Portadores de Glicogenose Tipo I

| Idade | Dia | Noite | Necessidade de glicose |
|--------------|--|--|------------------------|
| 0-12 meses | Aleitamento materno / Fórmula infantil (sem lactose, com maltodextrina) a cada 2-3 horas. A partir de 6 meses: maltodextrina da fórmula é substituída por arroz/milho (acima de 6%) | CNGDF se possível por 12 horas (50% → 35% energia), caso contrário: alimentações frequentes | 7-9 mg/kg por minuto |
| 1-3 anos | 3 refeições com PCCS e 2 lanches (preferencialmente PCCS) UCCS (4 horas de intervalo, 1,0-1,5 g/kg) | CNGDF durante 12 horas (35% de energia), caso contrário: UCCS (4 horas de intervalo, 1,0-1,5 g/kg) | 6-8 mg/kg por minuto |
| 3-6 anos | 3 refeições com PCCS e 2 lanches (preferencialmente PCCS) UCCS (4-6 horas de intervalo, 1,5-2,0 g/kg) | CNGDF durante 12 horas (35% de energia), caso contrário: UCCS (4-6 horas de intervalo, 1,5-2,0 g/kg) | 6-7 mg/kg por minuto |
| 6-12 anos | 3 refeições com PCCS e 2 lanches (preferencialmente PCCS) UCCS (6 horas de intervalo, 1,5-2,0 g/kg) | CNGDF durante 10 horas (30% de energia), caso contrário: UCCS (6 horas de intervalo, 1,5-2,0 g/kg) | 5-6 mg/kg por minuto |
| Adolescentes | 3 refeições com PCCS e 2 lanches (preferencialmente com PCCS) UCCS (6 horas de intervalo, 1,5-2,0 g/kg) | CNGDF durante 10 horas (30% de energia), caso contrário: UCCS (6 horas de intervalo, 1,5-2,0 g/kg) | 5 mg/kg por minuto |
| Adultos | 3 refeições com PCCS e 2 lanches (preferencialmente com PCCS) UCCS: (6 horas de intervalo, 1,5-2,0g/kg) | CNGDF durante 8-10 horas (25%-30% de energia), caso contrário: UCCS (6-8 horas de intervalo, 2,0 g/kg) CNGDF e UCCS durante a noite para substituição aos finais de semana e feriados | 3-4 mg/kg por minuto |

PCCS: Amido Pré Cozido

UCCS: Amido Cru

CNGDF: Alimentação Noturna Contínua Via Sonda Gástrica

TABELA 5 - Metas Bioquímicas Na Glicogenose Tipo I

| | |
|---|---|
| 1 | Glicemia pré prandial >3,5 – 4,0 mmol/l |
| 2 | Relação lactato/creatinina urinária < 0,06 mmol/mmol |
| 3 | Concentração sérica de ácido úrico no limite superior da normalidade para idade e valor laboratorial. |
| 4 | Base excess em sangue venoso > -5 mmol/l e bicarbonato em sangue venoso > 20 mmol/l |
| 5 | Concentração sérica de triglicérides < 6,0 mmol/l |
| 6 | Concentração fecal normal de α -1-antitripsina para Glicogenose Ib |
| 7 | Índice de massa corpórea entre 0,0 e + 2,0 desvios padrão |

1.3.9. Prognóstico

A elucidação dos mecanismos moleculares e bioquímicos envolvidos na doença permitiu a racionalização da investigação diagnóstica, do tratamento e seguimento ambulatorial dos pacientes com glicogenose tipo Ia.

Com a instituição do tratamento, prevenindo a hipoglicemia, melhoraram as alterações metabólicas relativas à acidose láctica, hiperuricemia, dislipidemia e os parâmetros clínicos relacionados ao crescimento e desenvolvimento neurológico, bem como as complicações tardias ^{(12) (14) (38) (42) (99) (100) (101) (102)}.

Aderência ao tratamento e precocidade no diagnóstico são fundamentais para uma boa evolução nas doenças onde o tratamento não é curativo.

A incidência de algumas complicações foi relacionada à época do diagnóstico e início de tratamento ^{(48) (58)}.

O diagnóstico pré-natal, amplamente desejado, ocorre apenas quando existe um antecedente familiar.

A maioria dos diagnósticos é realizada através da suspeição clínica, que deve ser confirmada com a análise da atividade enzimática em fragmentos de tecido hepático ou através da análise de mutações.

O diagnóstico precoce pressupõe geralmente que um lactente jovem de 3-4 meses seja submetido a uma biópsia hepática, muitas vezes a céu aberto, devido à necessidade de um grande fragmento para a realização da mensuração da atividade enzimática. Esse procedimento invasivo e com riscos inerentes ao ato cirúrgico e anestésico, torna a realização do diagnóstico precoce um grande desafio.

Com a identificação do cDNA, a identificação do gene G6PC e sua localização no locus 17q21 tornou-se possível estabelecer o diagnóstico de certeza da glicogenose tipo Ia

através de técnicas moleculares pelo rastreamento das mutações da G6PC ^{(19) (24) (67) (68) (69) (70)}
^{(71) (72) (73) (74) (75) (76) (77) (78) (79) (80) (81) (82) (83) (84) (85) (86) (87) (88) (89) (90) (91) (92) (93)}.

Este método, diferente de seu antecessor (mensuração da atividade enzimática em microsossomos hepáticos) permite o diagnóstico da doença sem a necessidade de procedimentos invasivos, podendo ser realizado em amostras de sangue periférico. Assim, a análise de mutações, além de segurança para o paciente, apresenta outra vantagem sob o método antecessor.

A existência de laboratórios capazes de realizar a mensuração da atividade enzimática em fragmentos de biópsia hepática, bem como a análise de mutações do gene G6PC é restrita a poucos centros especializados. Amostras de sangue em papel periférico são facilmente transportadas em papel filtro, enquanto tecido hepático exige uma logística e cuidados muito mais complicados.

2. OBJETIVO

2.1. Objetivo Geral

Avaliar as mutações no gene G6PC em pacientes com suspeita clínica de glicogenose tipo Ia através de seqüenciamento.

2.2. Objetivo Específico

Desenvolver um teste baseado em técnicas moleculares, para detecção das mutações mais freqüentes que causam a GSDIa, padronizado para amostras de sangue armazenadas em papel filtro.

3. MATERIAIS E MÉTODOS:

3.1. Casuística

Foram estudados 16 pacientes de 14 diferentes famílias, sendo 7 originalmente do Ambulatório de Hepatologia do Departamento de Pediatria da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo e 9 encaminhados a esse serviço durante novembro de 2005 a novembro de 2006.

Das 14 diferentes famílias, 7 tinham história de consangüinidade.

Os critérios de inclusão no estudo foram:

- Pacientes com suspeita clínica de glicogenose tipo Ia, ou seja, aqueles que apresentavam hepatomegalia associada à hipoglicemia ou hipertrigliceridemia ou hipercolesterolemia.
- Pacientes com diagnóstico de glicogenose tipo Ia previamente confirmado pela análise da atividade enzimática em fragmentos de tecido hepático.

Durante a consulta o paciente e suas famílias foram convidados a comparecer a uma entrevista, onde foram explicados os objetivos da pesquisa e os procedimentos a serem realizados. Os pacientes encaminhados por outros serviços foram informados a respeito dos objetivos da pesquisa e dos procedimentos a serem realizados, pelos seus respectivos médicos, que haviam sido orientados pelos pesquisadores.

Obteve-se previamente a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo e pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) conforme o parecer de número 11943/2007, (anexo 1). Todos os pacientes ou responsáveis formalizaram sua anuência através de termo de consentimento livre e esclarecido (anexo 2)

3.2. Métodos

3.2.1. Coleta de Material

Foi realizada anti-sepsia com álcool 70°GL na região da veia braquial e secado com gaze esterilizada.

Foi realizada punção venosa para coleta 1 mL de sangue. Com a seringa o sangue foi gotejado em papel filtro do tipo “FTA Gene Card” de forma a preencher 4 círculos de aproximadamente 1,5 cm de diâmetro previamente marcados no papel filtro. Aguardou-se a secagem do material em temperatura ambiente, e acondicionou-se o material protegido contra umidade ou ressecamento, ao abrigo da luz em saco plástico.

3.2.2. Extração de DNA

O DNA foi extraído por método padronizado no Laboratório de Medicina Molecular do Departamento de Ciências Fisiológicas da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo (ainda não publicado – Rocha et.al).

Foram removidos, utilizando um perfurador Olfá, três discos (círculos) de aproximadamente 3 mm do cartão “FTA Gene Card” contendo amostra de sangue e colocados em um tubo eppendorf de 1,7 mL, onde foram adicionados 80 µL de água destilada. A mistura foi incubada com a tampa aberta a 60°C em bloco térmico durante 12 horas.

Após esse período foram adicionados ao tubo agora seco, 50µL de água destilada e incubada a mistura por 10 minutos.

Após, centrifugou-se a mistura por 30 minutos a 14000 rpm, deixando o DNA em suspensão. Após a extração, o DNA em suspensão foi transferido para um novo tubo e foi armazenado em refrigeração -20°C, sob proteção da luz.

3.2.3. Amplificação através da reação em cadeia da polimerase dos 5 exons que compõem o gene G6PC.

A amplificação foi realizada utilizando-se os primers (TABELA 6), que flanquearam os 5 exons em fragmentos de diferentes tamanhos (FIGURAXII):

TABELA 6 Sequência dos Primers Utilizados para Flanquear os 5 Exons do Gene G6PC

| Exon | Seqüência dos primers (5'→3') | Fragmentos (bp) |
|------|--|-----------------|
| 1 | Direto-1 TCT GCT GAC ATC TTC CT | 307 |
| | Inverso-1 GCC TCT TTT CTT GCT GA | |
| 2 | Direto-2 GCA TTC ATT CAG TAA CCC | 192 |
| | Inverso-2 TCC ACT CAG CTT CTG TCT | |
| 3 | Direto-3 CAC CTT TAC TCC ATT CTC | 209 |
| | Inverso-3 GTG GTG TGT CAG CTA CA | |
| 4 | Direto-4 GCC AGG CTC CAA CAT TT | 259 |
| | Inverso-4 GGA GAG AAA CGG AAT GG | |
| 5 | Direto-5 CTT CCT ATC TCT CAC AG | 647 |
| | Inverso-5 TCA CTT GCT CCA AAT ACC | |

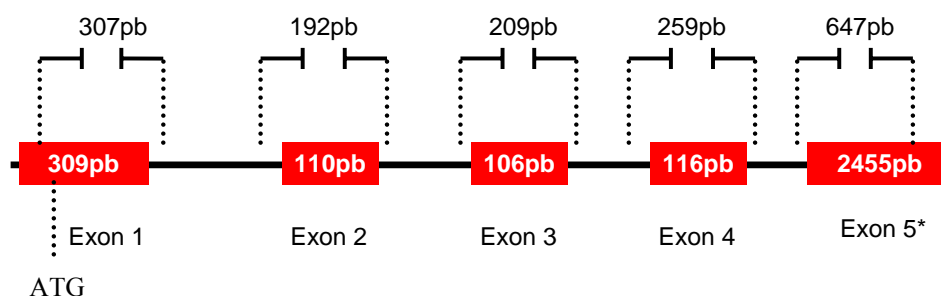


FIGURA XII – Tamanho dos fragmentos amplificados e suas posições em relação aos exons

⁽¹⁹⁾ * No exon V somente 509 pares de bases são codificadores ⁽¹⁹⁾ e o fragmento de 647 pb os encerra.

Na reação utilizamos reagentes do “GeneAmp - PCR reagent kit with AmpliTaq DNA polymerase PERKIN ELMER, Branchburg, New Jersey, USA” nº catálogo N801-0055.

- 200 ng de DNA genômico
- 3µL de solução tampão(100mM Tris-HCl pH 8.3; 500 mM KCl; 15 mM MgCl₂; 0.01 w/v gelatina) 10X
- 0,2 mM de dNTPs (desoxinucleotídeos)
- 20 pmol de cada primer (direto e inverso)
- 2,5 U de Taq DNA polimerase

para um volume final de reação de 30 µL.

A mistura foi colocada em termociclador (GeneAmp(R) PCR System 9700 Applied Biosystem, Foster City,CA, USA) para amplificação dos exons do gene G6PC, sendo submetida a 30 ciclos (FIGURA XIII):

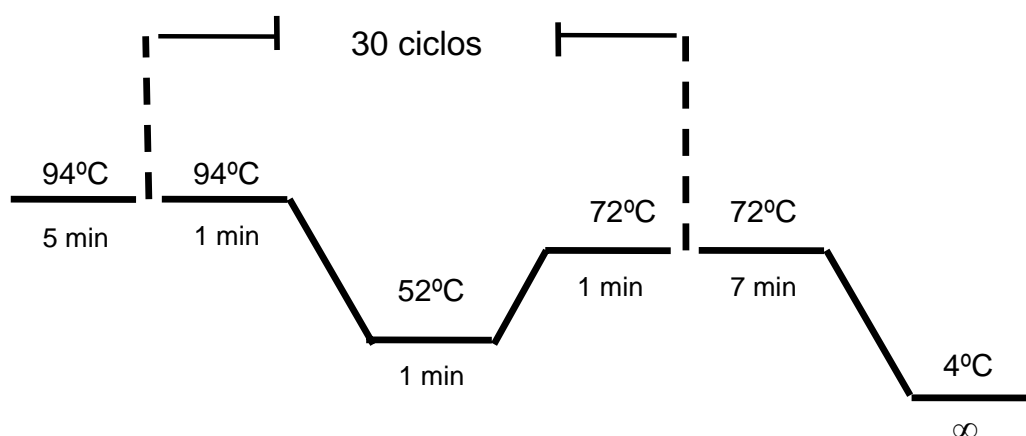


FIGURA XIII– Representação do protocolo utilizado na programação do termociclador para a execução da reação de amplificação dos fragmentos dos 5 exons do gene G6PC.

O produto final da reação foi então armazenado refrigerado a -20°C, protegido da luz.

3.2.4. Purificação do Produto de PCR

A 5 μ L do produto de PCR foram adicionados 2 μ L da enzima SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase) e 0,5 μ L da enzima EXOI (Exonuclease I), em gelo (0°C), sendo a homogeneização realizada com pipeta.

A mistura foi incubada a 37°C por 15 minutos para ativação das enzimas SAP e EXOI, sendo após incubada a 80°C durante 15 minutos para inativação das mesmas.

3.2.5. Reação de Sequenciamento

A 1 μ L do produto de PCR purificado foram adicionados 4 μ L de água, 3 μ L de tampão, 1 μ L de Primer da PCR 1,6 pmol/ μ L (direto ou inverso) e 1 μ L do kit de sequenciamento (Kit Big Dye Terminator 3.1).

A mistura foi incubada a 96°C por 10 segundos, 50°C por 5 segundos e 60°C por 4 minutos por 25 ciclos (FIGURA XIV).

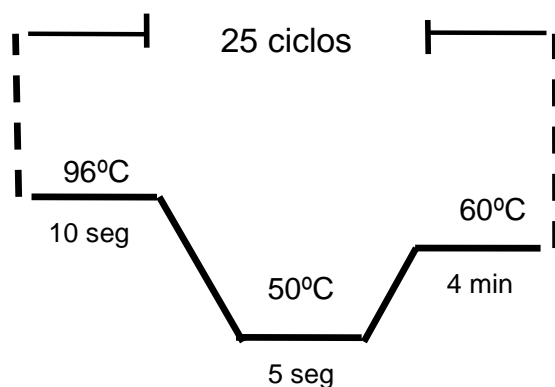


FIGURA XIV – Representação do protocolo utilizado para programação do termociclador para a execução da reação de sequenciamento.

3.2.6. Purificação da reação de sequenciamento para BigDye (3,1):

Foram adicionados ao produto de reação de sequenciamento 50 μL de isopropanol 65%, prosseguindo-se com homogeneização com uso de vortex e transferência para tubo de 1,5 mL. A solução foi deixada por 20 minutos à temperatura ambiente no escuro. A seguir foi centrifugada por 25 minutos a temperatura ambiente. Retirado o sobrenadante desta solução com a pipeta e adicionado 250 μL de etanol 60% . A solução foi homogeneizada e centrifugada por 5 minutos a 1400 rpm em temperatura ambiente Foi seca no bloco térmico por 90°C por 1 minuto ou em temperatura ambiente por 1 hora. Adicionados 15 μL de formamida Hi Die, homogeneizado com uso de vortex (spin), e transferido para o tubo usado no seqüenciador. Desnaturado a 95°C por 2 minutos. Transferido imediatamente para o gelo e levado ao seqüenciador.

3.2.7. Sequenciamento Automático

Para análise das mutações foi realizado o sequenciamento, utilizando-se seqüenciador automático ABI PRISM 310, que é baseado no método de terminação de cadeia usando didesoxinucleotídeos (ddNTP).

O sequenciamento automático foi realizado em ambas as fitas, direta e inversa, para que a análise das seqüências fosse feita duas vezes em cada fragmento, aumentando a confiança no resultado.

3.2.8. Análise do Sequenciamento

Os resultados do sequenciamento foram salvos em eletroferogramas analisados com o programa ChromasPro MFC Application, versão 1.2.2.3.

Os eletroferogramas foram transformados em arquivo de texto analisado com o auxílio do programa Gene Runner versão 3.0.5.

Neste programa as seqüências obtidas foram comparadas com a seqüência do gene G6PC referida no banco de dados Consensus CDS Database ⁽¹⁰⁶⁾. E a região intrônica foi comparada com a seqüência do gene G6PC referida no banco de dados Gene Atlas: Gene Database – G6PC ⁽²¹⁾.

3.2.9. Avaliação das Mutações Mais Frequentes do Gene G6PC por Meio de Enzima de Restrição (RFLP-Restriction Fragment Length Polymorphism)

Uma vez identificadas as mutações através da análise dos resultados do sequenciamento automático com o programa Gene Runner, as 2 mais frequentes foram selecionadas como alvo para padronização de teste rápido.

Como as 2 mutações mais frequentes, R83C e Q347X, alteravam sítios de restrição de enzimas conhecidas, a técnica de RFLP foi escolhida para sua detecção.

Para a mutação R83C foi escolhida a enzima HgaI (New England Biolabs-cod. R0154L)⁽¹⁰⁷⁾ e para a mutação Q347X foi escolhida a enzima Bfa I (New England Biolabs-cod. R0568L)⁽¹⁰⁸⁾.

Na mutação R83C⁽⁸¹⁾ há a troca de uma base C por uma base T, resultando na substituição de um aminoácido arginina por cisteína.

A seqüência normal (Anexo 3) e a mutante (Anexo 4) obtidas com os primers escolhidos para flanquear o exon 2 ⁽¹⁰⁶⁾ sob a ação da enzima HgaI (New England Biolabs-cod. R0154L)⁽¹⁰⁷⁾ são cortadas em fragmentos de tamanhos diferentes (FIGURAXV):

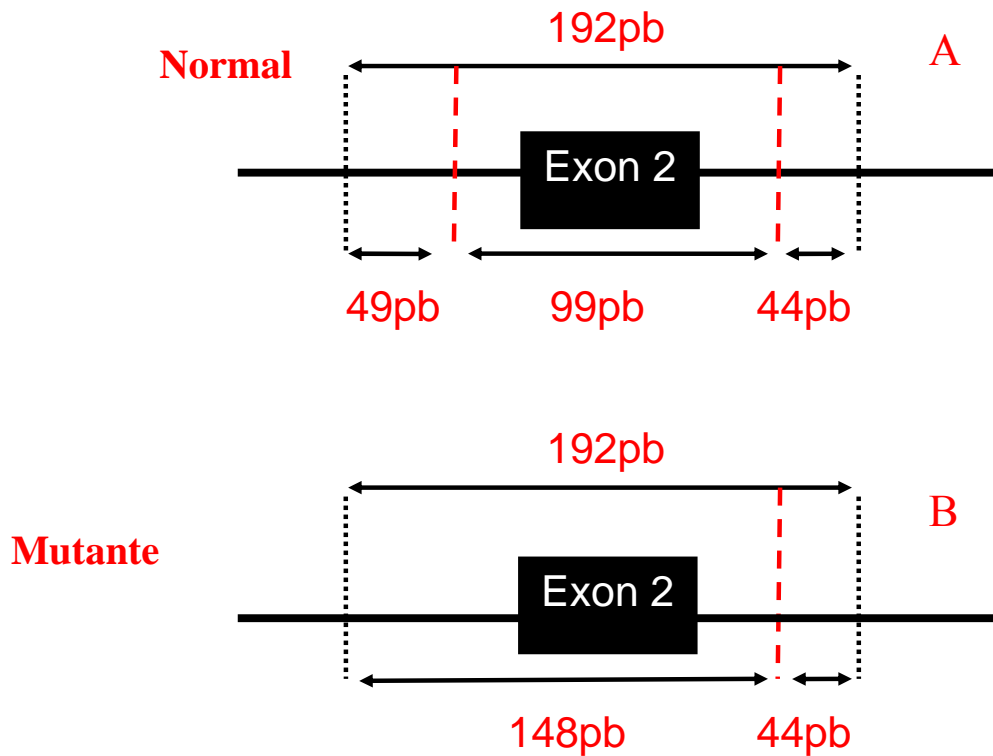


FIGURA XV

- A) Representação dos fragmentos obtidos com a digestão de um fragmento normal flanqueado pelos primers do exon 2 pela enzima HgaI.
- B) Representação dos fragmentos obtidos com a digestão de um fragmento mutante flanqueado pelos primers do exon 2 pela enzima HgaI.

..... Limites do fragmento flanqueado pelos primers.

- - - - - Cortes obtidos com a enzima HgaI

Na mutação Q347X há a troca de uma base C por T, resultando em substituição de uma aminoácido glutamina, por um “stop códon”⁽⁸¹⁾.

A seqüência normal (Anexo 5) e a mutante (Anexo 6), obtidas com os primers escolhidos para flanquear o exon 5⁽¹⁰⁶⁾ sob a ação da enzima Bfa I (New England Biolabs-cod. R0568L)⁽¹⁰⁸⁾ são cortadas em fragmentos de tamanhos diferentes (FIGURA XVI).

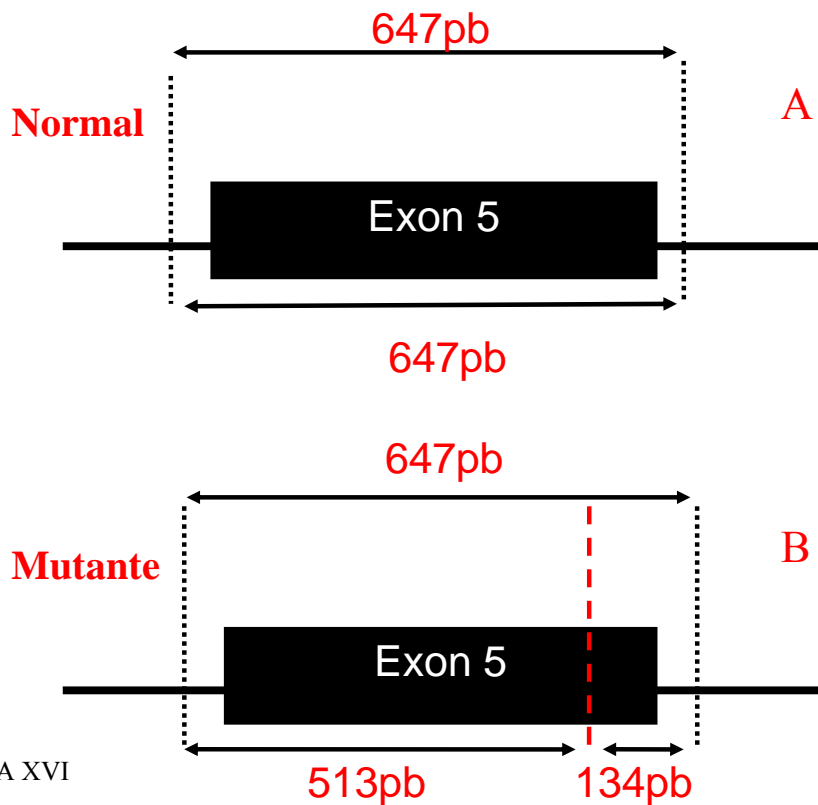


FIGURA XVI

- A) Representação do fragmento obtido com a digestão de um fragmento normal flanqueado pelos primers do exon 5 pela enzima BfaI.
- B) Representação dos fragmentos obtidos com a digestão de um fragmento mutante flanqueado pelos primers do exon 5 pela enzima BfaI.

..... Limites do fragmento flanqueado pelos primers.

- - - - - Cortes obtidos com a enzima HgaI

Nas reações de digestão utilizando-se a enzima BfaI foram utilizados:

- 4 μ L do produto de PCR do exon 5.
- 10 U da enzima Bfa I
- 1 μ L de solução tampão da enzima
- volume final de 10 μ L

Nas reações de digestão utilizando a enzima HgaI foram utilizados:

- 4 μ L do produto de PCR do exon 2.
- 6 U da enzima Hga I
- 1 μ L de solução tampão da enzima
- volume final de 10 μ L

As digestões foram realizadas durante 4 horas em TA. Ao produto de reação da digestão foram adicionados 2 μ L de Bluejuice™ Gel loading Buffer (Invitrogen), e submetido à corrida eletroforética em um gel de agarose 3% com brometo de etídio (0,05%).

No gel foi aplicado marcador de peso molecular de 50pb (5 μ L). e marcador “low DNA mass ladder” (2 μ L) para quantificação do DNA.

O gel foi submetido à eletroforese a 100V, 50mA com um tempo de corrida de 20 minutos.

Após esse período o gel foi colocado em transiluminador para visualização das bandas sob luz ultravioleta com posterior realização de documentação fotográfica.

4. RESULTADOS

4.1. Análise das mutações pela técnica de sequenciamento automático

Foram encontrados em 13 pacientes (TABELA 7), 5 mutações no gene G6PC (FIGURA XVII) detectados pelo sequenciamento dos 5 exons, sendo:

- Pacientes 1, 2, 3, 4, 5, 6, 10, 11 com 2 mutações pontuais conhecidas em homozigose ou em heterozigose composta.
- Pacientes 7, 8, 9 com 1 mutação pontual conhecida e 1 nova mutação pontual.
- Paciente 12 com apenas 1 mutação conhecida.
- Paciente 13 com 2 mutações pontuais silenciosas em heterozigose.

Nos pacientes 14, 15 e 16 não foi encontrada nenhuma alteração em nenhum dos 5 exons do gene G6PC (TABELA 7).

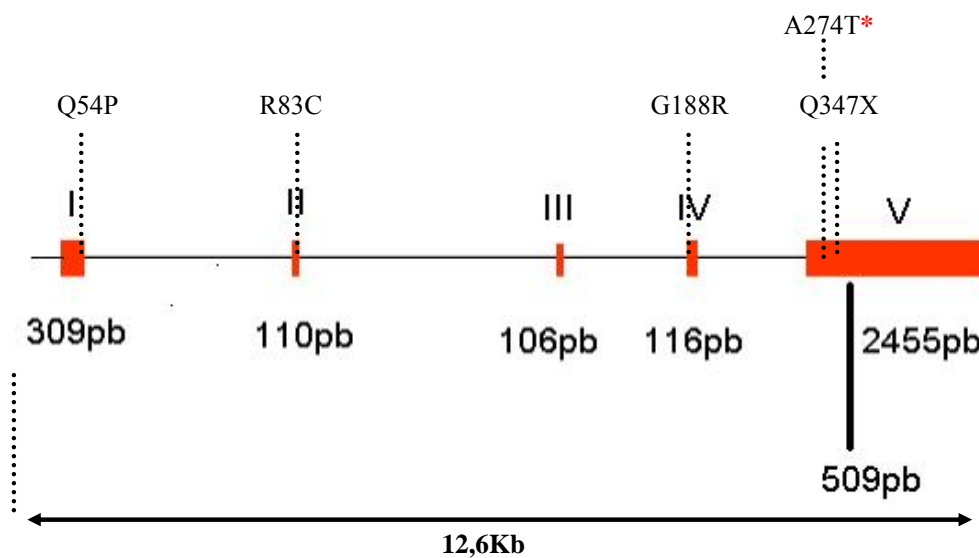


FIGURA XVII – Mutações encontradas na análise molecular do gene g6PC

*Nova Mutação

TABELA 7 Resumo das Alterações Encontradas no Gene G6PC

| Família | Paciente | Alelo 1 | | | Alelo 2 | | | Pai | Mãe |
|---------|-------------|---------|---------------------|---------|---------|---------------------|---------|------|-------|
| | | Exon | Troca de Aminoácido | Mutação | Exon | Troca de Aminoácido | Mutação | | |
| 1 | 1 C | 1 | CAG→CCG | Q54P | 1 | CAG→CCG | Q54P | *** | *** |
| 2 | 2 C | 2 | CGT→TGT | R83C | 2 | CGT→TGT | R83C | *** | *** |
| 3 | 3 C | 2 | CGT→TGT | R83C | 2 | CGT→TGT | R83C | *** | *** |
| 4 | 4 C | 4 | GGC→CGC | G188R | 4 | GGC→CGC | G188R | *** | *** |
| 5 | 5 | 2 | CGT→TGT | R83C | 5 | CAG→TAG | Q347X | R83C | Q347X |
| 6 | 6 C | 2 | CGT→TGT | R83C | 2 | CGT→TGT | R83C | R83C | R83C |
| 7 | 7 | 2 | CGT→TGT | R83C | 5 | GCT→ACT | *A274T | *** | *** |
| 8 | 8 | 2 | CGT→TGT | R83C | 5 | GCT→ACT | *A274T | R83C | A274T |
| | 9 | 2 | CGT→TGT | R83C | 5 | GCT→ACT | *A274T | R83C | A274T |
| 9 | 10 C | 5 | CAG→TAG | Q347X | 5 | CAG→TAG | Q347X | *** | Q347X |
| | 11 C | 5 | CAG→TAG | Q347X | 5 | CAG→TAG | Q347X | *** | Q347X |
| 10 | 12 | 2 | CGT→TGT | R83C | Ø | Ø | Ø | Ø | R83C |
| 11 | 13 | 1 | TAC→TAT | Y44Y | 5 | TCG→TCA | S356S | *** | *** |
| 12 | 14 | Ø | Ø | Ø | Ø | Ø | Ø | *** | *** |
| 13 | 15 | Ø | Ø | Ø | Ø | Ø | Ø | *** | *** |
| 14 | 16 | Ø | Ø | Ø | Ø | Ø | Ø | *** | *** |

* Mutação nova

Ø Mutação não encontrada

*** Teste não realizado

C = história de consangüinidade

Nos pacientes 1, 2, 3, 4, 5, 6, 10 e 11 o diagnóstico molecular confirmou o diagnóstico clínico de glicogenose tipo Ia, todos apresentavam hepatomegalia e hipoglicemia na histórica clínica. No paciente 12, que apresentava hepatomegalia, hipoglicemia, hipertrigliceridemia, hipercolesterolemia, hiperuricemia, acidose metabólica (lática), foi observado apenas uma mutação, porém, seguindo a recomendação do roteiro de investigação proposto por Rake et. Al²³ assume-se que de glicogenose tipo Ia seja o mais provável.

No paciente 13, com 2 mutações pontuais silenciosas em heterozigose composta, não é possível inferir o diagnóstico de glicogenose tipo Ia, este paciente apresentava história de infecção congênita e hepatomegalia ao nascimento e a partir de 1 ano de vida foi observado hipoglicemia. Para os pacientes 7, 8 e 9, cuja análise molecular revelou a presença de uma mutação conhecida e uma nova mutação, associada ao quadro clínico de hepatomegalia, hipoglicemia, hipertrigliceridemia a hipercolesterolemia, sugere-se fortemente o diagnóstico de glicogenose tipo Ia. As famílias 7 e 8 são procedentes e naturais de locais diferentes.

Os pacientes 14 e 15 apresentavam história de hepatomegalia, hipoglicemia e acidose lática. O paciente 16 apresentava história de hepatomegalia e hipoglicemia. Os eletroferogramas das fitas direta e inversa com as alterações encontradas foram fotografados (anexo 7).

Em um total de 14 famílias diferentes, foram observadas mutações do gene G6PC, na seguinte proporção: 10 alelos com a mutação R83C (35,71%), 3 alelos com a mutação Q347X (10,71%), 2 alelos com a mutação G188R (7,14%), 2 alelos com a mutação Q54P (7,14%), 2 alelos com a mutação nova A274T (7,14%), 1 alelo com a mutação silenciosa Y44Y (3,57%), 1 alelo com a mutação silenciosa S356S (3,57%) e 7 alelos normais (25%).

As mutações R83C e Q347X foram eleitas para o desenvolvimento do “teste rápido”.

A pesquisa da nova mutação A274T foi realizada em 100 indivíduos normais através da técnica de RFLP utilizando a enzima Hinf I (New England Biolabs-cod. R0155L)

4.2. Análise das mutações R83C e Q347X pela técnica de RFLP

Os produtos da PCR foram corados com brometo de etídio e submetidos a eletroforese antes de serem submetidos à digestão enzimática, a fim de verificar os tamanhos intactos dos produtos de amplificação (FIGURA XVIII).

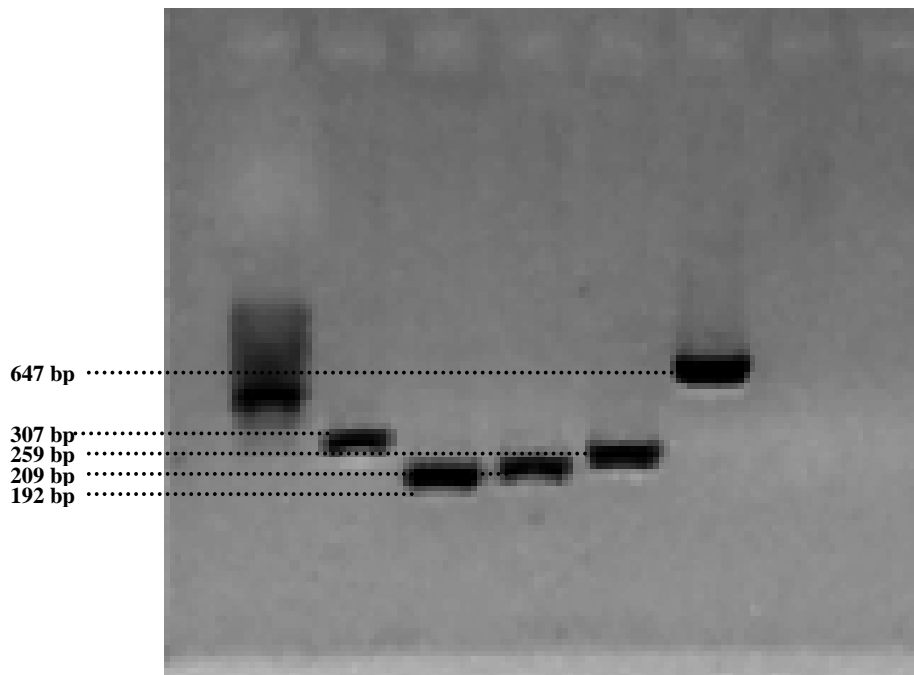


Figura XVIII – Foto de gel mostrando 6 poços (da esquerda para direita) ladder e os 5 fragmentos amplificados com os tamanhos de 307 bp, 192 bp, 209 bp, 259 bp e 647 bp.

O DNA dos pacientes cuja análise molecular revelou a presença das mutações R83C e Q347X foi novamente amplificado através da reação em cadeia da polimerase e submetido à digestão enzimática.

As mutações R83C em homozigose dos pacientes 2, 3 e 6 e em heterozigose dos pacientes 5, 7, 8, 9 e 12 foram confirmadas através da digestão enzimática utilizando a enzima HgaI

Observamos a disposição das bandas do fragmento referente à amplificação do exon 2 após 4 horas de digestão (FIGURA XIX).

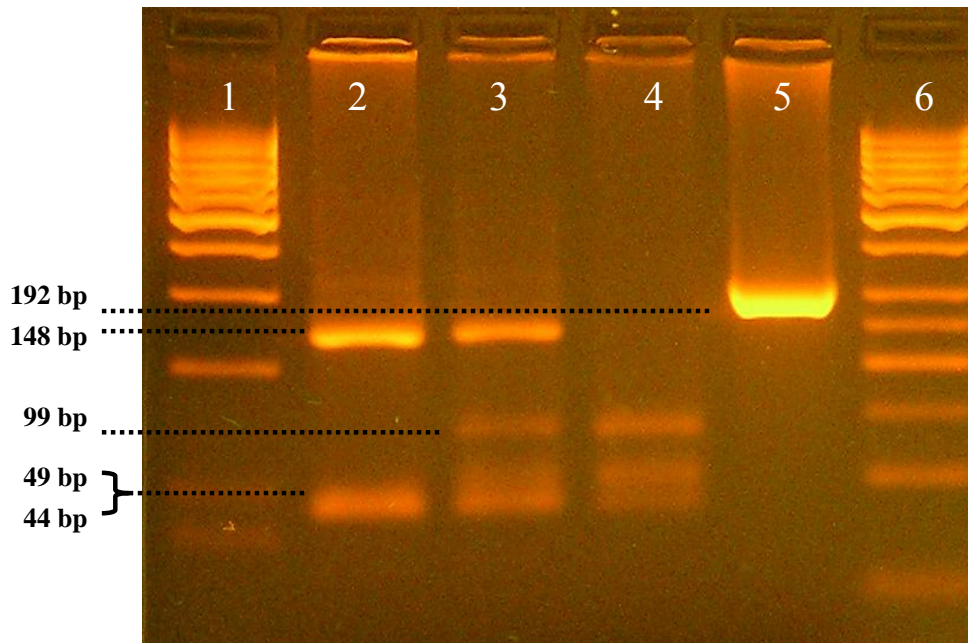


FIGURA XIX – Corrida eletroforética em gel de agarose 3 % do fragmento da amplificação do exon 2 após digestão com a enzima Hga I

1 - Ladder 50 bp. 2 - Paciente 6 (homozigoto para R83C). 3 - Paciente 5 (heterozigoto para R83C). 4 - Controle negativo (normal). 5 - Fragmento não digerido. 6 - Ladder low mass.

As mutações Q347X em homozigose dos pacientes 10 e 11 e em heterozigose do paciente 5 foram confirmadas através da digestão enzimática utilizando a enzima BfaI.

Observamos a disposição das bandas do fragmento referente à amplificação do exon 5 após 4 horas de digestão (FIGURA XX).

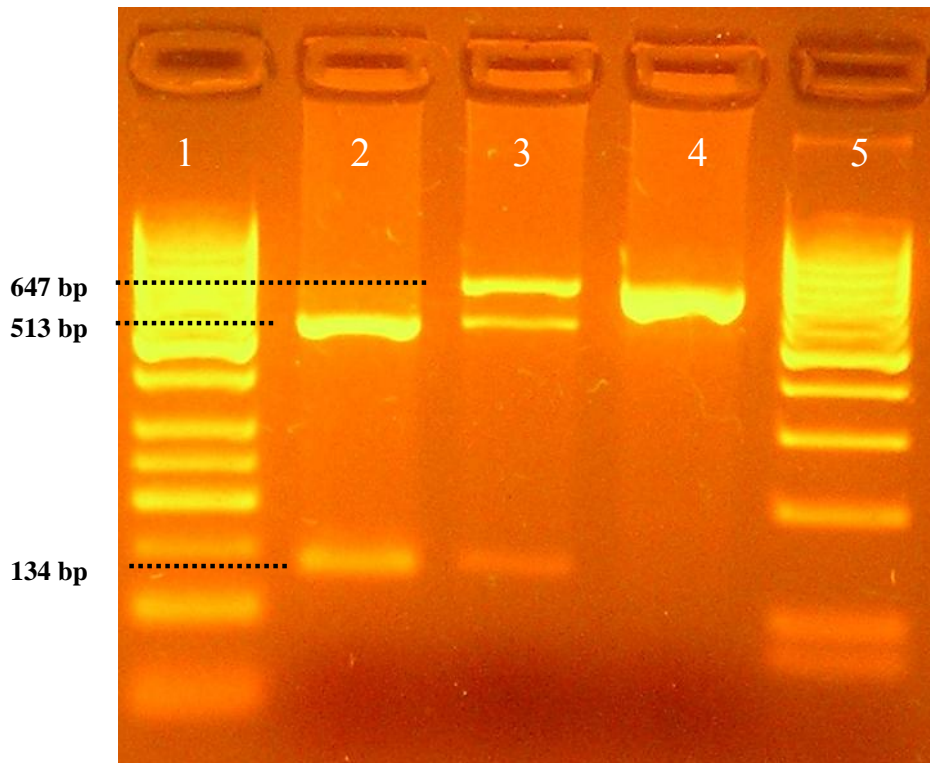


Figura XX – Corrida eletroforética em gel de agarose 3 % do fragmento da amplificação do exon 5 após digestão com a enzima Bfa I

1 - Ladder 50 bp.2 - Paciente 10 (homozigoto para Q347X).3 - Paciente 5 (heterozigoto para 347X).4 - Controle negativo (normal).5 - Ladder low mass.

5. Discussão

As principais alterações observadas na glicogenose tipo Ia são: hipoglicemia, dislipidemia, hiperuricemia e acidose metabólica (lática)⁽⁴⁾. O diagnóstico precoce da doença exige elevada suspeição clínica. O diagnóstico torna-se provável quando as anormalidades clínicas e laboratoriais são, aliadas a testes funcionais para investigação de hipoglicemias (teste do glucagon ou teste da epinefrina) e exame anátomo-patológico de tecido hepático, no qual pode-se observar intensa esteatose e /ou acúmulo intenso de glicogênio nos hepatócitos, levam a hipótese diagnóstica.

Contudo, o diagnóstico de certeza é realizado somente através da mensuração da atividade enzimática da glicose-6-fosfatase –sub-unidade catalítica em microsomos hepáticos, obtidos através de biópsia hepática, muitas vezes a céu aberto devido à necessidade de um grande fragmento para a realização do exame.

Este procedimento invasivo e com riscos inerentes ao ato cirúrgico e anestésico, bem como o elevado custo e requisitos técnicos necessários para a mensuração da atividade enzimática, fazem com que este teste seja restrito a poucos centros especializados, o que torna o diagnóstico da doença um grande desafio.

Com a identificação do gene G6PC, tornou-se possível estabelecer o diagnóstico de certeza da glicogenose tipo Ia por técnicas de biologia molecular, através do rastreamento das mutações do gene G6PC ⁽¹⁹⁾.

Este método molecular, diferente da mensuração da atividade enzimática em microsomo hepático, permite o diagnóstico da doença sem a necessidade de procedimentos invasivos, podendo ser realizado em amostras de sangue periférico, já que as mutações estão presentes nas células germinativas. Desta forma, é possível realizar os diagnósticos precocemente, de forma segura e rápida.

O sequenciamento dos 5 exons do gene G6PC e de parte dos introns imediatamente adjacentes aos exons é extremamente sensível para diagnosticar a doença, visto que a codificação da proteína depende fundamentalmente dessas regiões, que englobam a totalidade das mutações já identificadas na glicogenose tipo Ia

Mutação da região promotora ou de outras regiões que interajam à distância, fazem com que nem todas as mutações sejam identificadas pelo sequenciamento da região codificadora.

Outra possibilidade para o resultado negativo é logicamente, a possibilidade de outro diagnóstico. Mesmo com uma criteriosa avaliação baseada nas alterações clínicas e laboratoriais, pacientes com glicogenose tipo Ib, glicogenose tipo Ic e glicogenose tipo III podem ser clínico e laboratorialmente indistinguíveis. Assim, a existência de resultados falsos negativos embora improvável é possível.

Neste estudo, dos 16 pacientes avaliados, 13 apresentaram alterações no gene G6PC, sendo que 1 apresentou 2 mutações silenciosas, ou seja, 12 pacientes foram diagnosticados para a glicogenose tipo Ia através da análise genética.

Os pacientes com análise da atividade enzimática da sub-unidade catalítica da G6Pase, (pacientes 6, 10 e 11) também foram identificados pela análise genética através do sequenciamento do gene.

Ou seja, houve 100% de concordância entre a análise enzimática e a análise molecular do gene.

A literatura internacional aponta as mutações R83C e Q347X como as mais frequentes⁽²³⁾. Em um estudo anterior realizado em nosso país, esse dado foi corroborado⁽⁷⁰⁾. Em nosso estudo observamos nas famílias em que foram encontradas mutações, 50% de mutação R83C (10 em 20 alelos) e 15% de mutação Q347X (3 em 20 alelos).

Diante desse cenário, a oportunidade de desenvolver testes rápidos para a detecção dessas mutações e assim, simplificar o diagnóstico da glicogenose tipo Ia para os pacientes suspeitos em nosso meio se faz imperativo.

Através da técnica de RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) foi possível identificar essas duas mutações pontuais sem a necessidade do sequenciamento automático.

Reduz-se assim o tempo e os insumos necessário nesse procedimento. Mais do que isso, esse atalho permite que laboratórios com menor infra-estrutura realizem a análise genética da glicogenose tipo Ia. Laboratórios com aparelhos de sequenciamento para análise genética são restritos a grandes centros devido ao alto custo do equipamento e dos insumos necessários para o teste.

Para a realização do teste através da técnica de RFLP utiliza-se apenas termociclador, equipamento com custo muito menor. Assim, a padronização da técnica de RFLP possibilita que um número maior de laboratórios realize o teste genético, com custo e tempo muito menor que o necessário para o sequenciamento do gene.

Apesar do teste identificar apenas as mutações R83C e Q347X, as mesmas, são responsáveis pela maioria das mutações encontradas em nosso meio.

Todos os pacientes cujo sequenciamento identificou as mutações R83C em homozigose (pacientes 2, 3 e 6), em heterozigose (pacientes 5, 7, 8, 9 e 12) e Q347X em homozigose (pacientes 10 e 11) e em heterozigose (paciente 5) bem como os pais estudados (dos pacientes 5, 6 e 9), foram identificados de forma concordante tanto pelo sequenciamento quanto pelo teste utilizando a técnica de RFLP. Ou seja, em nosso estudo houve 100% de concordância entre o sequenciamento e o teste utilizando RFLP.

Durante o estudo foi identificada uma nova mutação (A274T). Ainda não foi possível a realização do estudo funcional para verificação se esta mutação causa diminuição ou até mesmo abolição da atividade da G6Pase. Entretanto, vários aspectos, corroboram a hipótese

de que a mutação A274T cause glicogenose tipo Ia. Primeiro, a troca GCT para ACT leva à substituição de um aminoácido alanina (A) por uma treonina (T). A alanina é um aminoácido não polar, neutro com índice hidropático de 1,8 (ou seja, é hidrofóbico), enquanto treonina é um aminoácido polar, neutro com índice hidropático de -0,7 (ou seja, é hidrofílico). Segundo, neste paciente nenhuma outra mutação gênica foi encontrada na região codificadora. Terceiro, a mutação determina a alteração de um aminoácido localizado na 7ª hélice transmembrana, região cuja integridade é fundamental para a atividade da enzima G6Pase. Quarto, a alteração não foi encontrada em 100 alelos de indivíduos normais não relacionados, excluindo a possibilidade de que se trate de polimorfismo neutro.

Assim, durante a realização do estudo, encontramos uma mutação ainda não descrita na literatura científica, cujos aspectos supracitados, fortemente sugerem que seja responsável pela ocorrência da glicogenose tipo Ia em nosso meio.

6. Conclusões

O estudo molecular do gene G6PC permite a realização do diagnóstico de certeza da glicogenose tipo Ia, de forma segura e rápida, sem a necessidade da realização de procedimentos invasivos.

Houve concordância entre os diagnósticos realizados pela técnica molecular e entre aqueles realizados pelo sequenciamento do gene e pela técnica de RFLP.

A frequência das mutações em nosso meio é semelhante à observada na literatura internacional, na qual as mutações R83C e Q347X também são as mais frequentes.

A padronização da técnica de RFLP para avaliação dessas 2 mutações permite a realização do diagnóstico da doença na maioria dos casos em nosso meio, sem a necessidade do sequenciamento genético. Além da necessidade de menor infra-estrutura, reduz-se o custo e tempo de realização do exame.

Mais do que a avaliação da frequência das mutações o estudo abre a possibilidade da realização precoce do diagnóstico da doença de forma simples, possibilitando que mais laboratórios em nosso meio realizem o diagnóstico da glicogenose tipo Ia.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1. Hoffmann G.F. – Preface. In *Vademecum Metabolicum*, 1ª edição
2. Saudubray JM, Charpentier C. Clinical phenotypes: diagnosis/algorithms. In: Scriver, CR; Beaudet, AL; Sly, W S; Valle, D. *The Metabolic & Molecular Bases of Inherited Disease*. McGraw-Hill, 2001, pp 1327- 1403.
3. Snappes I; Van Creveld S. Un cas d'hypoglycemie avec chez un enfant. *Bull Mem Soc Med Hop* 1928;52: 1315.
4. Chen YT. Glycogen Storage Diseases. In: Scriver, C. R.; Beaudet A. L.; et al.: *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 8th ed, vol 1. New York McGraw-Hill, 2001;1521-1551.
5. Von Gierke E. Hepato-nefro-megalia glycogenica (Glykogenspeicher-krankheit der Leber und Nieren). *Beitr Pathol Anat* 1929;82: 497.
6. Cori GT, Cori CF. Glucose-6-phosphatase of the liver in glycogen storage disease. *J. Biol. Chem* 1952 Dec;199: 661-667.
7. Senior B, Loridan L. Studies of glycogeneses, with particular reference to the metabolism of intravenously administered glycerol. *N Engl J Med* 1968 Oct; 279: 958.
8. Lange A.; Arion W, Beaudet A.. Type Ib glycogen storage disease is caused by a defect in the glucose-6-phosphatase translocase of the microsomal glucose-6-phosphatase system. *J Biol Chem* 1980 Sep; 255:8381.
9. Nordlie R, Sukalski K.; Munoz J, Baldwin JJ. Type Ic, a novel glycogenosis. Underlying mechanisms. *J Biol Chem* 1983 Aug;258:9739.
10. Chen YT, Burchell A.. Glycogen Storage Diseases. In: Scriver, C. R.; Beaudet A. L.; et al.: *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 7th ed, vol 1. New York McGraw-Hill, 1995; 935-949.
11. Beaudet AL. In: Wilson JD et al. *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 12thed, New York McGraw-Hill, 1991; 1854-1860.
12. Weinstein DA., Wolfsdorf JI. Glycogen Storage Diseases: A Primer for Clinicians. *The Endocrinologist* 2002;12: 531-538.
13. Fernandes J, Smit G. The Glycogen Storage Diseases. In: Fernandes J, Saudubray JM, Van Den Berghe G, eds. *Inborn Metabolic Diseases: Diagnosis and Treatment*. 87-101.

14. Rake JP, Visser G, Labrune P, Leonard JV, Ullrich K, Smit GP. Glycogen storage disease type I: diagnosis, management, clinical course and outcome. Results of the European Study on Glycogen Storage Disease Type I (ESGSD I). *Eur J Pediatr*. 2002 Oct;161 Suppl 1:S20-34.
15. eMedicine. [on line]. Specialties. Endocrinology. Metabolic Disorders. Glycogen Storage Disease, Type Ia. [citado 12 mai 2006]. Disponível em: <http://www.emedicine.com/med/topic906.htm>
16. Matern D, Seydewitz HH, Bali D, Lang C, Chen YT. Glycogen storage disease type I: diagnosis and phenotype/genotype correlation. *Eur J Pediatr*. 2002 Oct;161 Suppl 1:S10-9. Epub 2002 Jul 27
17. OMIM-Online Mendelian Inheritance in Man [on line] Glycogen Storage Disease I. [citado 15 ago 2005] Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=232200>
18. HUGO Gene Nomenclature Committee [on line]. G6PC. [citado 25 abr 2005]. Disponível em: http://www.gene.ucl.ac.uk/nomenclature/data/get_data.php?hgnc_id=4056
19. Lei KJ, Shelly LL, Pan CJ, Sidbury JB, Chou JY. Mutations in the glucose-6-phosphatase gene that cause glycogen storage disease type Ia. *Science* 1993 Oct; 262: 580-583.
20. Geneatlas: Gene Database [on line]. G6PC [citado 11 jan 2006]. Disponível em : <http://www.dsi.univ-paris5.fr/genatlas/fiche.php?symbol=G6PC>
21. Geneatlas: Gene Database [on line]. G6PC. Variant 1 [citado 11 jan 2006]. Disponível em : http://www.dsi.univ-paris5.fr/genatlas/17/html/G6PC_1.html
22. Human Gene Mutation Database [on line]. G6PC. [citado 13 out 2006]. Disponível em : <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/gene.php?gene=G6PC>
23. Rake JP, ten Berge AM, Visser G, Verlind E, Niezen-Koning KE, Buys CH, et al. Glycogen storage disease type Ia: recent experience with mutation analysis, a summary of mutations reported in the literature and a newly developed diagnostic flow chart. *Eur J Pediatr*. 2000 May;159(5):322-30.
24. Chou JY, Mansfield BC. Molecular genetics of type 1 glycogen storage diseases. *Trends Endocr. Metab* 1999 Apr; 10 (3): 104-113.
25. Pan CJ, Lei KJ, Annabi B, Hemrika W, Chou JY. Transmembrane topology of glucose-6-phosphatase. *J Biol Chem* 1998 May;273: 6144.

26. HUGO Gene Nomenclature Committee [on line]. G6PC. [citado 25 abr 2005]. Disponível em:
http://www.gene.ucl.ac.uk/nomenclature/data/get_data.php?hgnc_id=4061
27. Hemrika W, Renirie R, Dekker HL, Barnett P, Wever R. From phosphatases to vanadium peroxidases: a similar architecture of the active site. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Mar; 94(6):2145-9.
28. Arion WJ, Wallin BK; Lange AJ; Ballas LM. On the involvement of a glucose-6-phosphate transport system in the function of microsomal glucose-6-phosphate. *Molec. Cell. Biochem.* 6: 75-83, 1975.
29. Arion WJ, Canfield WK, Callaway ES, Burger HJ, Hemmerle H, Schubert G, et al. Direct evidence for the involvement of two glucose 6-phosphate-binding sites in the glucose-6-phosphatase activity of intact liver microsomes. Characterization of T1, the microsomal glucose 6-phosphate transport protein by a direct binding assay. *J Biol Chem*. 1998 Mar;273(11):6223-7.
30. Bandsma RH, Smit GP, Kuipers F. Disturbed lipid metabolism in glycogen storage disease type 1. *Eur J Pediatr*. 2002 Oct;161 Suppl 1:S65-9. Epub 2002 Jul 13.
31. Hers HG. Mechanisms of blood glucose homeostasis. *J Inherit Metab Dis*. 1990;13(4):395-410. Review.
32. Forget PP, Fernandes J, Haverkamp-Begemann P (1974) Tri-. glyceride clearing in glycogen storage disease. *Pediatr Res* 8:. 114–119.
33. McGarry JD, Brown NF. The mitochondrial carnitine palmitoyltransferase system. From concept to molecular analysis. *Eur J Biochem*. 1997 Feb 15;244(1):1–14.
34. Levy, E., Thibault, L., Roy, C. C., Letarte, J., Lambert, M., Seidman, E. G. 1990. Mechanisms of hypercholesterolaemia in glycogen storage disease type I: defective metabolism of low density lipoprotein in cultured skin fibroblasts. *Eur. J. Clin. Invest.* 20:253-260
35. McGarry JD, Foster DW. Regulation of hepatic fatty acid oxidation and ketone body production. *Annu Rev Biochem*. 1980;49:395-420.
36. Chen YT, Glycogen Storage Diseases. In Behrman RE, Kliegman RM, Jenson HB. *Nelson Textbook of Pediatrics*, 17th ed. International Edition, Elsevier; 2004. p 500.
37. Wolfsdorf JI, Holm IA, Weinstein DA. Glycogen storage diseases. Phenotypic, genetic, and biochemical characteristics, and therapy. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 1999 Dec;28(4):801-23.
38. Talente GM, Coleman RA, Alter C, Baker L, Brown BI, Cannon RA, et al. Glycogen storage disease in adults. *Ann Intern Med*. 1994 Feb 1;120(3):218-26.

39. Ubels FL, Rake JP, Slaets JP, Smit GP, Smit AJ. Is glycogen storage disease 1a associated with atherosclerosis? *Eur J Pediatr.* 2002 Oct;161 Suppl 1:S62-4. Epub 2002 Jul 2.
40. Ullrich, K.; Smit, G. P. A. : Clinical aspects of glycogen storage disease type I: summary of the discussions. *Europ. J. Pediatr.* 152 (suppl. 1): S87-S88, 1993.
41. Carves C, Duquenoy A, Toutain F, Trioche P, Zarnitski C, Le Roux P, Le Luyer B. Gouty tendinitis revealing glycogen storage disease Type Ia in two adolescents. *Joint Bone Spine.* 2003 Mar;70(2):149-53.
42. Weinstein DA, Wolfsdorf JI. Effect of continuous glucose therapy with uncooked cornstarch on the long-term clinical course of type 1a glycogen storage disease. *Eur J Pediatr.* 2002 Oct;161 Suppl 1:S35-9. Epub 2002 Jul 31.
43. Weinstein DA, Roy CN, Fleming MD, Loda MF, Wolfsdorf JI, Andrews NC. Inappropriate expression of hepcidin is associated with iron refractory anemia: implications for the anemia of chronic disease. *Blood.* 2002 Nov 15;100(10):3776-81. Epub 2002 Jun 28.
44. Chen YT, Bazzarre CH, Lee MM, Sidbury JB, Coleman RA. Type I glycogen storage disease: nine years of management with cornstarch. *Eur J Pediatr.* 1993;152 Suppl 1:S56-9.
45. Mundy HR, Hindmarsh PC, Matthews DR, Leonard JV, Lee PJ. The regulation of growth in glycogen storage disease type 1. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2003 Mar;58(3):332-9.
46. Moses SW. Historical highlights and unsolved problems in glycogen storage disease type 1. *Eur J Pediatr.* 2002 Oct;161 Suppl 1:S2-9. Epub 2002 Aug 23.
47. Lee PJ. Glycogen storage disease type I: pathophysiology of liver adenomas. *Eur J Pediatr.* 2002 Oct;161 Suppl 1:S46-9. Epub 2002 Jul 12.
48. Parker P, Burr I, Slonim A, Ghishan FK, Greene H. Regression of hepatic adenomas in type Ia glycogen storage disease with dietary therapy. *Gastroenterology.* 1981 Sep;81(3):534-6.
49. Restaino I, Kaplan BS, Stanley C, Baker L. Nephrolithiasis, hypocitraturia, and a distal renal tubular acidification defect in type 1 glycogen storage disease. *J Pediatr.* 1993 Mar;122(3):392-6.
50. Reitsma-Bierens WC. Renal complications in glycogen storage disease type I. *Eur J Pediatr.* 1993;152 Suppl 1:S60-2.
51. Chen YT, Coleman RA, Scheinman JI, Kolbeck PC, Sidbury JB. Renal disease in type I glycogen storage disease. *N Engl J Med.* 1988 Jan 7;318(1):7-11.

52. Weinstein DA, Somers MJ, Wolfsdorf JI. Decreased urinary citrate excretion in type 1a glycogen storage disease. *J Pediatr*. 2001 Mar;138(3):378-82.
53. Huismans D, Rake JP, Visser G, Piers DA, Smit GPA (1997). Decreased bone mineral density in glycogen storage disease. type 1. *J Inherit Metab Dis* 20[Suppl 1]: 81.
54. Rake JP, Visser G, Huismans D, Huitema S, van der Veer E, Piers DA, Smit GP. Bone mineral density in children, adolescents and adults with glycogen storage disease type Ia: a cross-sectional and longitudinal study. *J Inherit Metab Dis*. 2003;26(4):371-84.
55. Lee PJ, Patel JS, Fewtrell M, Leonard JV, Bishop NJ. Bone mineralisation in type 1 glycogen storage disease. *Eur J Pediatr*. 1995 Jun;154(6):483-7.
56. Schwahn B, Rauch F, Wendel U, Schonau E. Low bone mass in glycogen storage disease type 1 is associated with reduced muscle force and poor metabolic control. *J Pediatr*. 2002 Sep;141(3):350-6.
57. Mundy HR, Georgiadou P, Davies LC, Cousins A, Leonard JV, Lee PJ. Exercise capacity and biochemical profile during exercise in patients with glycogen storage disease type I. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005 May;90(5):2675-80. Epub 2005 Jan 25.
58. Melis D, Parenti G, Della Casa R, Sibilio M, Romano A, Di Salle F, et al. Brain damage in glycogen storage disease type I. *J Pediatr*. 2004 May;144(5):637-42.
59. Humbert M, Labrune P, Simonneau G. Severe pulmonary arterial hypertension in type 1 glycogen storage disease. *Eur J Pediatr*. 2002 Oct;161 Suppl 1:S93-6. Epub 2002 Jul 31.
60. Humbert M, Labrune P, Sitbon O, Le Gall C, Callebert J, Herve P, Samuel D, Machado R, Trembath R, Drouet L, Launay JM, Simonneau G. Pulmonary arterial hypertension and type-I glycogen-storage disease: the serotonin hypothesis. *Eur Respir J*. 2002 Jul;20(1):59-65.
61. Visser G, Rake JP, Kokke FT, Nikkels PG, Sauer PJ, Smit GP. Intestinal function in glycogen storage disease type I. *J Inherit Metab Dis*. 2002 Aug;25(4):261-7.
62. Hoffmann G.F. – Function tests. In *Vademecum Metabolicum*, 1ª edição, pág 25-26.
63. Fernandes J, Huijing F, van de Kamer JH. A screening method for liver glycogen diseases. *Arch Dis Child*. 1969 Jun;44(235):311-7.
64. Ockerman PA. Assay by a spectrofluorimetric method of glucose-6-phosphate in the liver in glycogen storage disease type 1. *Clin Chim Acta*. 1965 Oct;12(4):445-52.
65. Jevon GP, Finegold MJ. Reliability of histological criteria in glycogen storage disease of the liver. *Pediatr Pathol*. 1994 Jul-Aug;14(4):709-21.

66. McAdams AJ, Hug G, Bove KE. Glycogen storage disease, types I to X: criteria for morphologic diagnosis. *Hum Pathol.* 1974 Jul;5(4):463-87.
67. Trioche P, Francoual J, Audibert F, Chalas J, Lindenbaum A, Odievre M, et. al. Prenatal diagnosis of glycogen storage disease type Ia by restriction enzyme digestion. *Prenat Diagn.* 1998 Jun;18(6):629-31.
68. Angaroni CJ, de Kremer RD, Argarana CE, Paschini-Capra AE, Giner-Ayala AN, Pezza RJ, Pan CJ, Chou JY. Glycogen storage disease type Ia in Argentina: two novel glucose-6-phosphatase mutations affecting protein stability. *Mol Genet Metab.* 2004 Nov;83(3):276-9.
69. Qiu WJ, Gu XF, Ye J, Han LSh, Zhang YF, Liu XQ. Molecular genetic analysis of glycogen storage disease type Ia in 26 Chinese patients. *J Inherit Metab Dis.* 2003;26(8):811-2.
70. de C Reis F, Caldas HC, Norato DY, Schwartz IV, Giugliani R, Burin MG, et. al. Glycogen storage disease type Ia: molecular study in Brazilian patients. *J Hum Genet.* 2001;46(3):146-9.
71. Miltenberger-Miltenyi G, Szonyi L, Balogh L, Utermann G, Janecke AR. Mutation spectrum of type I glycogen storage disease in Hungary. *J Inherit Metab Dis.* 2005;28(6):939-44.
72. Qu Y, Abdenur JE, Eng CM, Desnick RJ. Molecular prenatal diagnosis of glycogen storage disease type Ia. *Prenat Diagn.* 1996 Apr;16(4):333-6.
73. Lei KJ, Pan CJ, Shelly LL, Liu JL, Chou JY. Identification of mutations in the gene for glucose-6-phosphatase, the enzyme deficient in glycogen storage disease type Ia. *J Clin Invest.* 1994 May;93(5):1994-9.
74. Parvari R, Lei KJ, Szonyi L, Narkis G, Moses S, Chou JY. Two new mutations in the glucose-6-phosphatase gene cause glycogen storage disease in Hungarian patients. *Eur J Hum Genet.* 1997 Jul-Aug;5(4):191-5.
75. Lei KJ, Shelly LL, Lin B, Sidbury JB, Chen YT, Nordlie RC, Chou JY. Mutations in the glucose-6-phosphatase gene are associated with glycogen storage disease types Ia and IaSP but not Ib and Ic. *J Clin Invest.* 1995 Jan;95(1):234-40.
76. Chevalier-Porst F, Bozon D, Bonardot AM, Bruni N, Mithieux G, Mathieu M, et. al. Mutation analysis in 24 French patients with glycogen storage disease type Ia. *J Med Genet.* 1996 May;33(5):358-60.
77. Cvitanovic-Sojat Lj, Jurcic Z, Mucic-Pucic B, Shin Y, Podskarbi T. Mutation of the glucose-6-phosphatase gene in a Croatian girl with glycogen storage disease type Ia. *J Inherit Metab Dis* 1997, 20[suppl1]:9.

78. Keller KM, Schuetz M, Podskarbi T, Bindl L, Lentze MJ, Shin YS. A new mutation of the glucose-6-phosphatase gene in a 4-year-old girl with oligosymptomatic glycogen storage disease type 1a. *J Pediatr* 1998, 132:360-361.
79. Kozak L, Francova H, Hrabincova E, Stastna S, Peskova K, Elleder M. DNA analysis in Czech and Slovak patients with glycogen storage disease type 1a. *J Inher Metab Dis* 21[suppl2]:91.
80. Lam CW, But WM, Shek CC, Tong SF, Chan YS, Choy KW, et. al. Glucose-6-phosphatase gene (727G T) splicing mutation is prevalent in Hong Kong Chinese patients with glycogen storage disease type 1a. *Clin Genet* 1998, 53:184-190.
81. Lei KJ, Chen YT, Chen H, Wong LJC, Liu JL, McConkie-Rosell A, et.al. Genetic basis of glycogen storage disease type 1a: prevalent mutations at the glucose-6-phosphatase locus. *Am J Hum Genet* 1995, 57:766-771.
82. Matern D, Lang C, Beck S, Brandis M, Seydewitz HH. Diagnostik der glykogenose typ 1a: DNA-analyse aus leukozyten als alternative zum enzymassay aus einem frischen leberbiopsat. *Monatsschr Kinderheilkd* 1998, 146:660-664.
83. Hüner G, Podskarbi T, Schütz M, Baykal T, Sarbat T, Shin YS, Demirkol M. Molecular aspects of glycogen storage disease type 1a in Turkish patients: a novel mutation in the glucose-6-phosphatase gene. *J Inher Metab Dis* 1998, 21:445-446.
84. Hwu JL, Chuang SH, Tsai LP, Chang MH, Chuang SM, Wang TR. Glucose-6-phosphatase gene G327A mutation is common in Chinese patients with glycogen storage disease type 1a. *Hum Mol Genet* 1995, 4:1095-1096.
85. Kajihara S, Matsuhashi S, Yamamoto K, Kido K, Tsuji K, Tanae A, et. a. Exon redefinition by a point mutation within exon 5 of the glucose-6-phosphatase gene is the major cause of glycogen storage disease type 1a in Japan. *Am J Hum Genet* 1995, 57:549-555.
86. Karasawa Y, Kobayashi M, Nakano Y, Aoki Y, Kawa S, Kiyosawa K, et. al. A case of glycogen storage disease type 1a with multiple hepatic adenomas and G727T mutation in the glucose-6-phosphatase gene, and a comparison with other mutations previously reported. *Am J Gastroenterol* 1998, 93:1550-1553.
87. Matsubara Y, Akanuma J, Takahashi K, Wataya K, Suzuki Y, Kure S, et. al. Molecular analysis of glycogen storage disease type 1a in Japanese patients: detection of aberrant splicing in ectopically expressed mRNA and development of a novel mutation detection system. Abstract 7th International Congress of Inborn Errors of Metabolism, Vienna, O15.1997

88. Okubo M, Aoyama Y, Kishimoto M, Shishiba Y, Murase T. Identification of a point mutation (G727T) in the glucose-6-phosphatase gene in Japanese patients with glycogen storage disease type 1a, and carrier screening in healthy volunteers. *Clin Genet* 1997, 51:179-183
89. Parvari R, HersHKovitz E, Carmi R, Moses S. Prenatal diagnosis of glycogen storage disease type 1a by single stranded conformation polymorphism (SSCP). *Prenat Diagn* 1996,16:862-865.
90. Parvari R, Lei K-J, Bashan N, HersHKovitz E, Koman SH, Barash V, et. al. Glycogen storage disease type 1a in Israel: biochemical, clinical and mutational studies. *Am J Med Genet* 1997, 72:286-290.
91. Parvari R, Isam J, Moses S. Glycogen storage disease type 1a in three siblings with the G270V mutation. *J Inherit Metab Dis* 1999, 22:149-154
92. Sartorato EL, Reis FC, Norato DYJ, Hackel C. A novel mutation in a Brazilian patient with glycogen storage disease type 1a. *J Inherit Metab Dis* 1998, 21:447
93. Seydewitz, H. H.; Matern, D. -Molecular genetic analysis of 40 patients with glycogen storage disease type 1a: 100% mutation detection rate and 5 novel mutations. *Hum. Mutat.* 15: 115-116, 2000.
94. Stroppiano M, Mazzotti R, Regis S, Gatti R. New mutation (S298P) in a patient with glycogen storage disease type 1a. *Human Mut* 1998, 12[suppl1]:S329.
95. Stroppiano M, Regis S, DiRocco M, Caroli F, Gandullia P, Gatti R. Mutations in the glucose-6-phosphatase gene of 53 Italian patients with glycogen storage disease type 1a. *J Inherit Metab Dis* 1999, 22:43-49.
96. Trioche P, Labrune P, Odievre M, Hedchouel M, Deleuze JF. Novel mutation (G188R) in the G6Pase gene of a patient with glycogen storage disease type 1a. *Human Mut* 1998, 12[suppl1]:S323-S324
97. Greene HL, Slonim AE, Burr IM. Type I glycogen storage disease: a metabolic basis for advances in treatment. *Adv Pediatr.* 1979;26:63-92.
98. Wolfsdorf JI, Plotkin RA, Laffel LM, Crigler JF Jr. Continuous glucose for treatment of patients with type 1 glycogen-storage disease: comparison of the effects of dextrose and uncooked cornstarch on biochemical variables. *Am J Clin Nutr.* 1990 Dec;52(6):1043-50.

99. Chen YT, Cornblath M, Sidbury JB. Cornstarch therapy in type I glycogen-storage disease. *N Engl J Med.* 1984 Jan 19;310(3):171-5
100. Crigler JF Jr, Folkman J. Glycogen storage disease: new approaches to therapy. *Ciba Found Symp.* 1977;(55):331-51.
101. Fernandes J, Jansen H, Jansen TC. Nocturnal gastric drip feeding in glucose-6-phosphatase deficient children. *Pediatr Res.* 1979 Apr;13(4 Pt 1):225-9.
102. Greene HL, Slonim AE, O'Neill JA Jr, Burr IM. Continuous nocturnal intragastric feeding for management of type 1 glycogen-storage disease. *N Engl J Med.* 1976 Feb 19;294(8):423-5.
103. Burr IM, O'Neill JA, Karzon DT, Howard LJ, Greene HL. Comparison of the effects of total parenteral nutrition, continuous intragastric feeding, and portacaval shunt on a patient with type I glycogen storage disease. *J Pediatr.* 1974 Dec;85(6):792-5.
104. Ehrlich RM, Robinson BH, Freedman MH, Howard NJ. Nocturnal intragastric infusion of glucose in management of defective gluconeogenesis with hypoglycemia. *Am J Dis Child.* 1978 Mar;132(3):241-3.
105. Rake JP, Visser G, Labrune P, Leonard JV, Ullrich K, Smit GP; European Study on Glycogen Storage Disease Type I (ESGSD I). Guidelines for management of glycogen storage disease type I - European Study on Glycogen Storage Disease Type I (ESGSD I). *Eur J Pediatr.* 2002 Oct;161 Suppl 1:S112-9. Epub 2002 Aug 24.
106. CCDS Database [on line]. CCDS11446.1 Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/CCDS/CdsBrowse.cgi?REQUEST=ALLFIELDS&DATA=CCDS11446.1&ORGANISM=0&BUILDS=CURRENTBUILDS>
107. Hga I. Disponível em: <http://www.neb.com/nebecomm/products/productR0154.asp>
108. Bfa I. Disponível em; <http://www.neb.com/nebecomm/products/productR0568.asp>

8. ANEXOS

Anexo 1 – Parecer do Comitê de Ética



MINISTÉRIO DA SAÚDE
Conselho Nacional de Saúde
Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP

PARECER Nº 1638/2005

Registro CONEP: 11943 (Este nº deve ser citado nas correspondências referentes a este projeto)

Registro CEP: 077-05

Processo nº 25000.072417/2005-18

Projeto de Pesquisa: "Avaliação da frequência das mutações responsáveis pela glicogênese la GSDIa-Doença de Von Gierke) e desenvolvimento de teste baseado em técnicas de biologia molecular para a detecção das mutações que causam a GSDIa, padronizado para amostras colhidas em Guthrie-Card".

Pesquisador Responsável: Dr. Marcelo Mori

Instituição: Irmandade Santa Casa de Misericórdia de São Paulo

Área Temática Especial: Genética humana.

Ao se proceder à análise do projeto de pesquisa em questão, em resposta ao Parecer CONEP nº 1219/2005, cabem as seguintes considerações:

- a) A Folha de Rosto foi reapresentada com complementações e correções.
- b) O orçamento detalhado foi adicionado ao protocolo.
- c) O projeto foi reapresentado com atendimento às adequações solicitadas, inclusive no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Previsão de aconselhamento genético foi considerada pelo pesquisador.
- d) As informações enviadas atendem aos aspectos fundamentais da Res. CNS 196/96 sobre diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos.
- e) O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa – CEP da instituição supracitada.

Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP, de acordo com as atribuições definidas na Res. CNS 196/96, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

Situação: Protocolo aprovado.

Brasília, 29 de setembro de 2005.


WILLIAM SAAD HOSSNE
Coordenador da CONEP/CNS/MS

ANEXO 2 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

PROJETO: “Avaliação da frequência das mutações responsáveis pela Glicogenose Ia (GSDIa-Doença de Von Gierke) e desenvolvimento de teste baseado em técnicas de biologia molecular para a detecção das mutações que causam a GSDIa, padronizado para amostras colhidas em Guthrie-Card.”

PESQUISADORES RESPONSÁVEIS:

Prof. Dr. Carlos Alberto Longui

Dr. Marcelo Mori

ENDEREÇO:

Departamento de Pediatria e Puericultura da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo
R. Dr. Cesário Mota jr. 112
Santa Cecília – São Paulo-SP – CEP: 01277-900
Fone: (11) 21767000 ramal:5533
e-mail:marcelomori@terra.com.br

IDENTIFICAÇÃO DO PACIENTE:

| | |
|--------------|-----------------------|
| Nome: | Registro do Hospital: |
| Nome do pai: | Nome da mãe: |
| Endereço: | |
| Bairro: | Cidade: |
| CEP: | Fone: |
| | UF: |

OBJETIVO DA PESQUISA:

Eu _____, R.G.: _____, entendo que meu filho foi convidado a participar como voluntário de um projeto de pesquisa, aprovado pelo Comitê de Ética da Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo envolvendo a avaliação genético-molecular dos indivíduos com glicogenose Ia. O objetivo desta pesquisa é investigar mutações no gene G6PC. O sangue colhido para a avaliação do DNA será preservado durante 5 anos e ao término deste período, se ainda desejarmos armazenar o material, um novo pedido será submetido ao CEP. Caso houver interesse de realizar um novo projeto de pesquisa com este material, o mesmo será submetido à análise do CEP e um novo consentimento será solicitado. O sigilo será mantido através da identificação dos pacientes por um código.

PROCEDIMENTO:

Eu entendo que, se concordar em participar desse estudo como voluntário, serei submetido à coleta de sangue (10 ml, o equivalente a duas colheres de sobremesa ou algumas gotas em papel filtro), não sendo necessária a hospitalização. As pesquisas laboratoriais utilizando a amostra de sangue poderão ser feitas durante um período indeterminado após a coleta de até 5 anos e após sua realização, essa amostra de sangue será destruída. Em todas as amostras coletadas o sigilo será mantido através da identificação dos pacientes por um código.

RISCO E DESCONFORTO:

Para a extração de DNA, serão necessários cerca de 10 ml de sangue venoso ou o papel filtro, que poderão ser obtidos em uma única ou mais coletas considerando as condições e faixa etária do paciente. Os riscos associados a esse procedimento são mínimos, podendo ocorrer dor e/ou manchas roxas (equimoses) no local da coleta de sangue. O desconforto será mínimo, pois, em geral, essa coleta será realizada da veia do braço, por profissional treinado e devidamente habilitado a realizá-la.

VANTAGENS:

Eu entendo que a minha participação neste projeto é voluntária e que as informações desta pesquisa em relação ao perfil genotípico estarão à minha disposição e que, a pesquisa de alterações nos genes envolvidos em glicogenose Ia poderá ser fundamental, no diagnóstico da doença, colaborando, assim, para que o casal seja adequadamente orientado quanto o risco de repetição entre os próximos filhos.

SIGILO:

Eu entendo que toda informação médica, assim como os resultados desse projeto de pesquisa, serão sigilosos. Se os resultados ou informações fornecidas forem utilizados para fins de publicação científica, nenhum nome será utilizado.

FORNECIMENTO DE INFORMAÇÃO ADICIONAL:

Eu entendo que posso requisitar informações adicionais relativas ao estudo a qualquer momento. Os responsáveis pela pesquisa, Dr. Marcelo Mori fone (11) 83790002 e Dr. Carlos Alberto Longui fone (11) 2176-7000 ramal 5533 estarão disponíveis para responder às minhas questões e preocupações.

RECUSA OU DESCONTINUAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO:

Eu entendo que a participação nesse projeto de pesquisa é voluntária e que eu posso recusar ou retirar meu consentimento, a qualquer momento (incluindo a retirada da amostra de sangue). Eu reconheço, também, que os responsáveis pela pesquisa podem interromper a minha participação nesse estudo a qualquer momento que julgar apropriado.

Nome do participante: _____

Assinatura do participante: _____

Nome da testemunha: _____

Assinatura da testemunha: _____

ANEXO 3 Sequência normal do exon 2 do gene G6PC

5'GCA TTC ATT CAG TAA CCC CAG AAA CTT GTT CTG TTT TTC CAT AGG ATT
 CTC TTT GGA CAG **C**GT CCA TAC TGG TGG GTT TTG GAT ACT GAC TAC TAC
 AGC AAC ACT TCC GTG CCC CTG ATA AAG CAG TTC CCT GTA ACC TGT GAG
 ACT GGA CCA GGT AAG CGT CCC AGC CCC TGC AGA CAG AAG CTG AGT GGA
 3'

ANEXO 4 Sequência mutante R83C do exon 2 do gene G6PC

5'GCA TTC ATT CAG TAA CCC CAG AAA CTT GTT CTG TTT TTC CAT AGG ATT
 CTC TTT GGA CAG **T**GT CCA TAC TGG TGG GTT TTG GAT ACT GAC TAC TAC
 AGC AAC ACT TCC GTG CCC CTG ATA AAG CAG TTC CCT GTA ACC TGT GAG
 ACT GGA CCA GGT AAG CGT CCC AGC CCC TGC AGA CAG AAG CTG AGT GGA
 3'

ANEXO 5 Sequência normal do exon 5 do gene G6PC

5' CTT CCT ATC TCT CAC AGT CAT GCT TTC TTC CAC TCA GGC ATT GCT GTT
 GCA GAA ACT TTC AGC CAC ATC CAC AGC ATC TAT AAT GCC AGC CTC AAG
 AAA TAT TTT CTC ATT ACC TTC TTC CTG TTC AGC TTC GCC ATC GGA TTT TAT
 CTG CTG CTC AAG GGA CTG GGT GTA GAC CTC CTG TGG ACT CTG GAG AAA
 GCC CAG AGG TGG TGC GAG CAG CCA GAA TGG GTC CAC ATT GAC ACC ACA
 CCC TTT GCC AGC CTC CTC AAG AAC CTG GGC ACG CTC TTT GGC CTG GGG
 CTG GCT CTC AAC TCC AGC ATG TAC AGG GAG AGC TGC AAG GGG AAA CTC
 AGC AAG TGG CTC CCA TTC CGC CTC AGC TCT ATT GTA GCC TCC CTC GTC
 CTC CTG CAC GTC TTT GAC TCC TTG AAA CCC CCA TCC CAA GTC GAG CTG
 GTC TTC TAC GTC TTG TCC TTC TGC AAG AGT GCG GTA GTG CCC CTG GCA
 TCC GTC AGT GTC ATC CCC TAC TGC CTC GCC **C**AG GTC CTG GGC CAG CCG

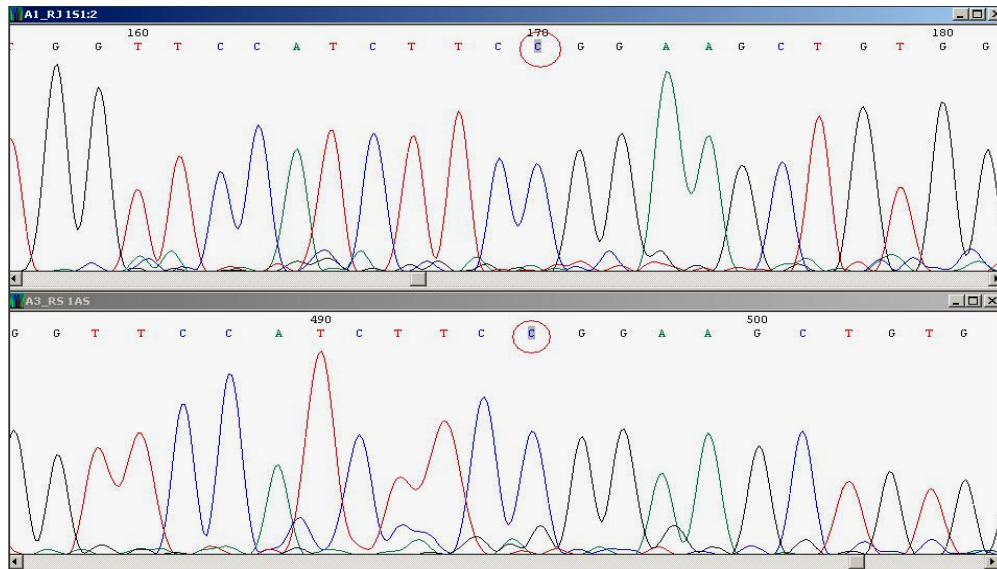
CAC AAG AAG TCG TTG TAA GAG ATG TGG AGT CTT CGG TGT TTA AAG TCA
ACA ACC ATG CCA GGG ATT GAG GAG GAC TAC TAT TTG AAG CAA TGG GCA
CTG GTA TTT GGA GCA AGT GA 3'.

ANEXO 6 Sequência mutante Q347X do exon 5 do gene G6PC

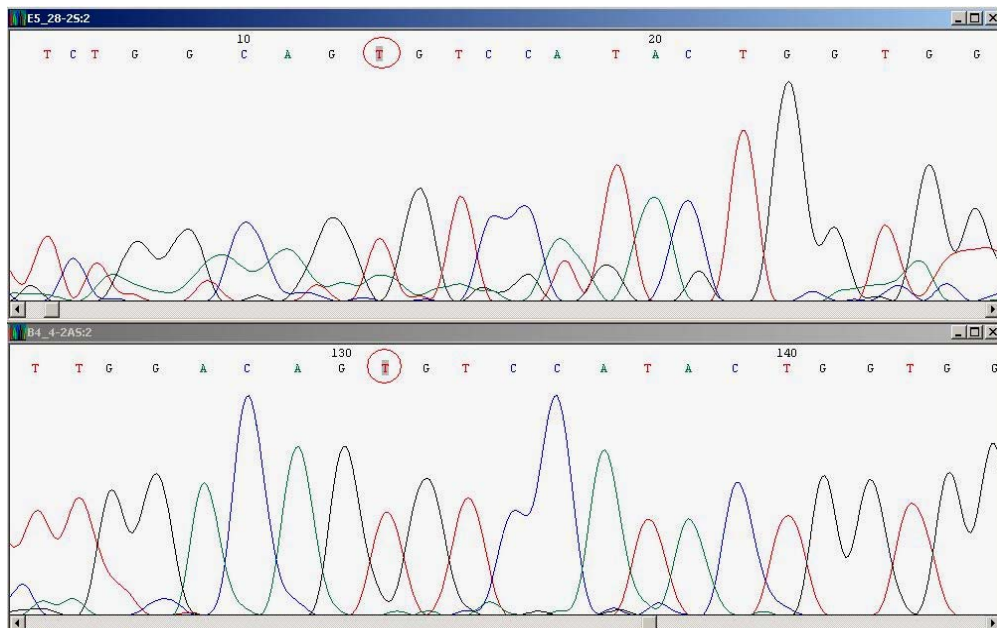
5' CTT CCT ATC TCT CAC AGT CAT GCT TTC TTC CAC TCA GGC ATT GCT GTT
GCA GAA ACT TTC AGC CAC ATC CAC AGC ATC TAT AAT GCC AGC CTC AAG
AAA TAT TTT CTC ATT ACC TTC TTC CTG TTC AGC TTC GCC ATC GGA TTT TAT
CTG CTG CTC AAG GGA CTG GGT GTA GAC CTC CTG TGG ACT CTG GAG AAA
GCC CAG AGG TGG TGC GAG CAG CCA GAA TGG GTC CAC ATT GAC ACC ACA
CCC TTT GCC AGC CTC CTC AAG AAC CTG GGC ACG CTC TTT GGC CTG GGG
CTG GCT CTC AAC TCC AGC ATG TAC AGG GAG AGC TGC AAG GGG AAA CTC
AGC AAG TGG CTC CCA TTC CGC CTC AGC TCT ATT GTA GCC TCC CTC GTC
CTC CTG CAC GTC TTT GAC TCC TTG AAA CCC CCA TCC CAA GTC GAG CTG
GTC TTC TAC GTC TTG TCC TTC TGC AAG AGT GCG GTA GTG CCC CTG GCA
TCC GTC AGT GTC ATC CCC TAC TGC CTC GCC **T**AG GTC CTG GGC CAG CCG
CAC AAG AAG TCG TTG TAA GAG ATG TGG AGT CTT CGG TGT TTA AAG TCA
ACA ACC ATG CCA GGG ATT GAG GAG GAC TAC TAT TTG AAG CAA TGG GCA
CTG GTA TTT GGA GCA AGT GA 3'.

ANEXO 7

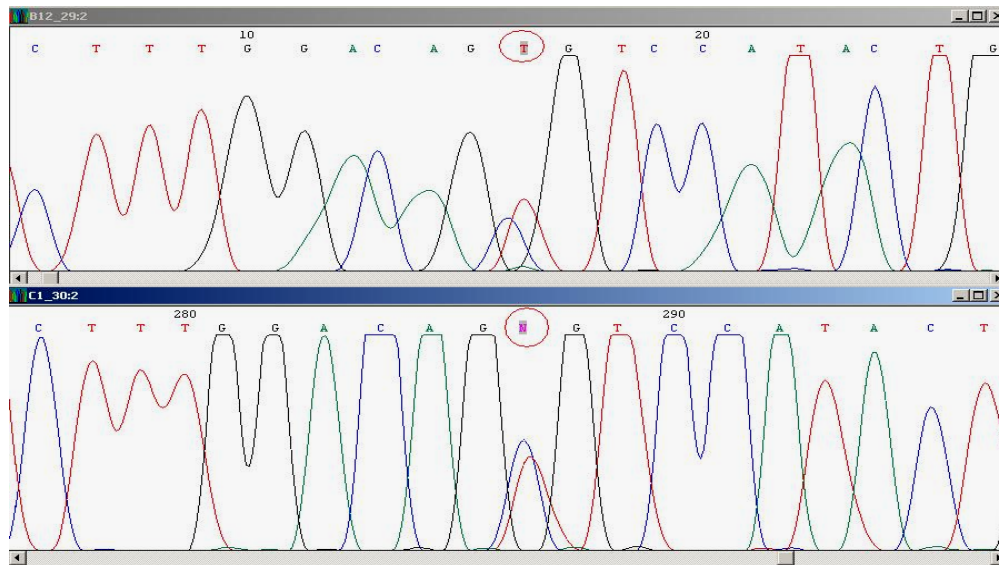
Eletroferogramas do exon 1 do paciente 1, mostrando a mutação Q54P (CAG-CCG) em homozigose nas fitas “direta” e “inversa”.



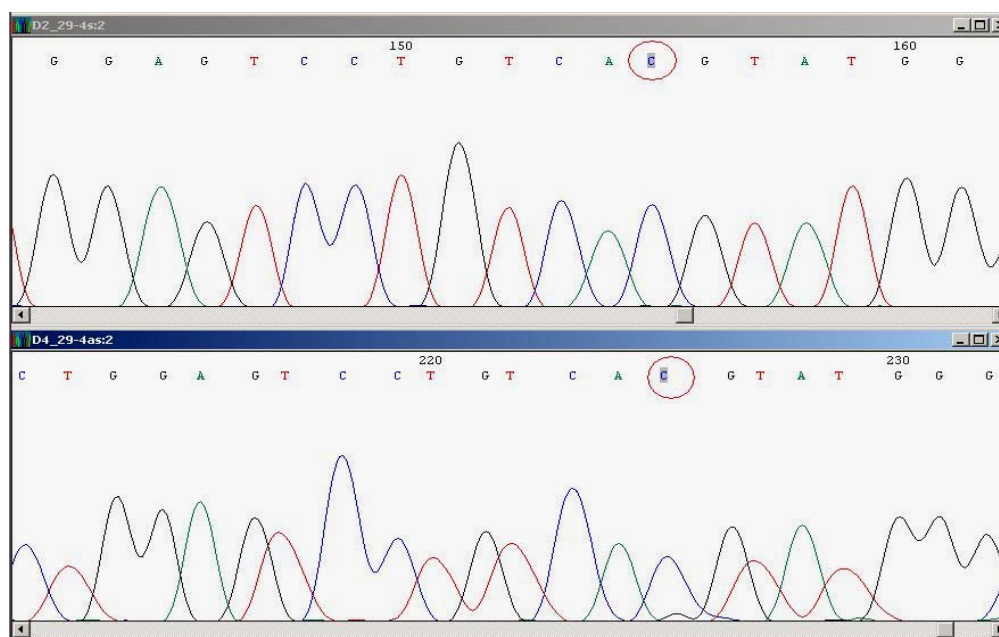
Eletroferogramas do exon 2 do paciente 2, mostrando a mutação R83C (CGT-TGT) em homozigose nas fitas “direta” e “inversa”.



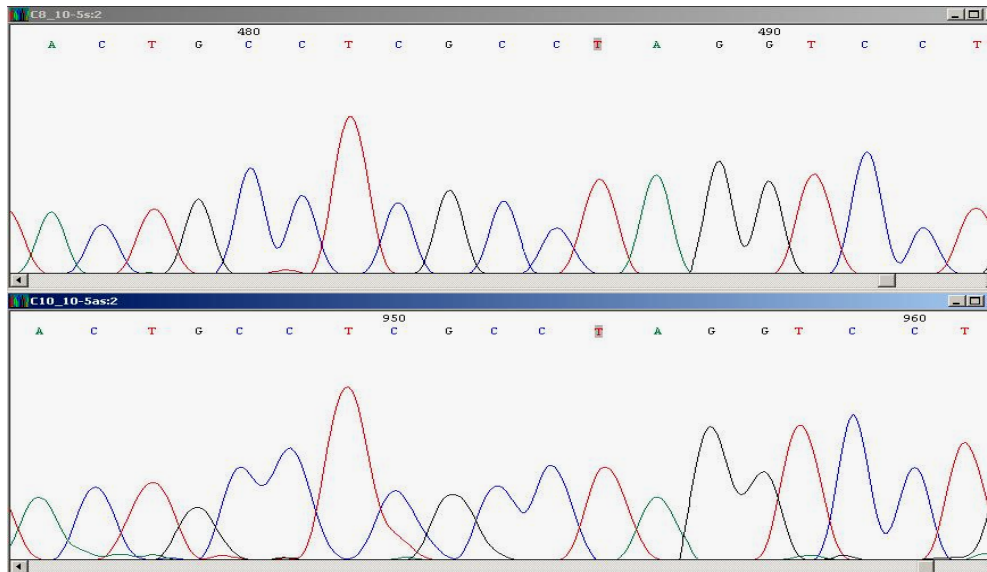
Eletroferogramas do exon 2 do paciente 12, mostrando a mutação R83C (CGT-TGT) em heterozigose nas fitas “direta” e “inversa”.



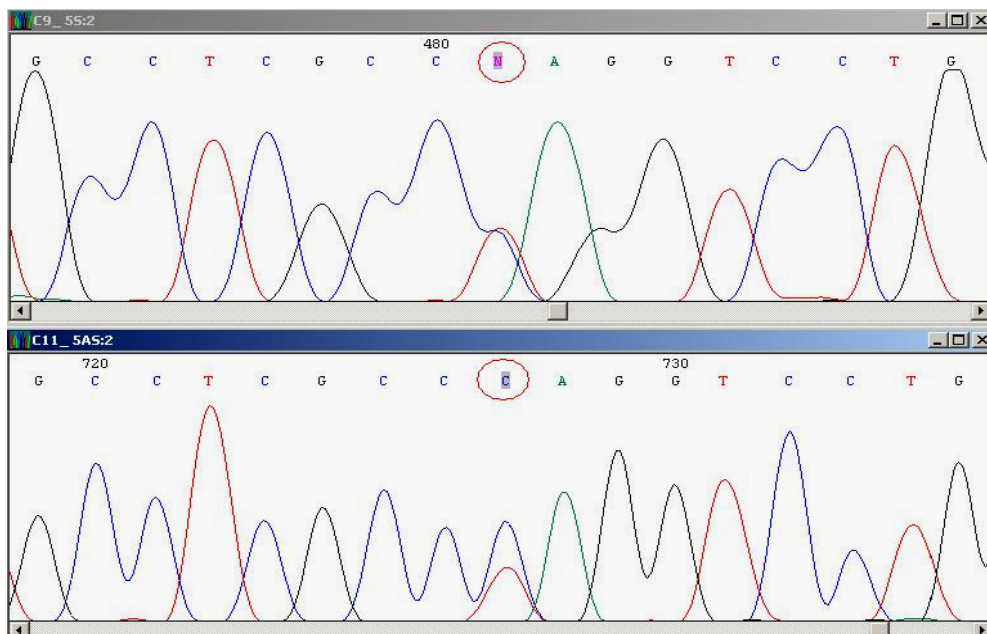
Eletroferogramas do exon 4 do paciente 4, mostrando a mutação G188R (GGC-CGC) em homozigose nas fitas “direta” e “inversa”.



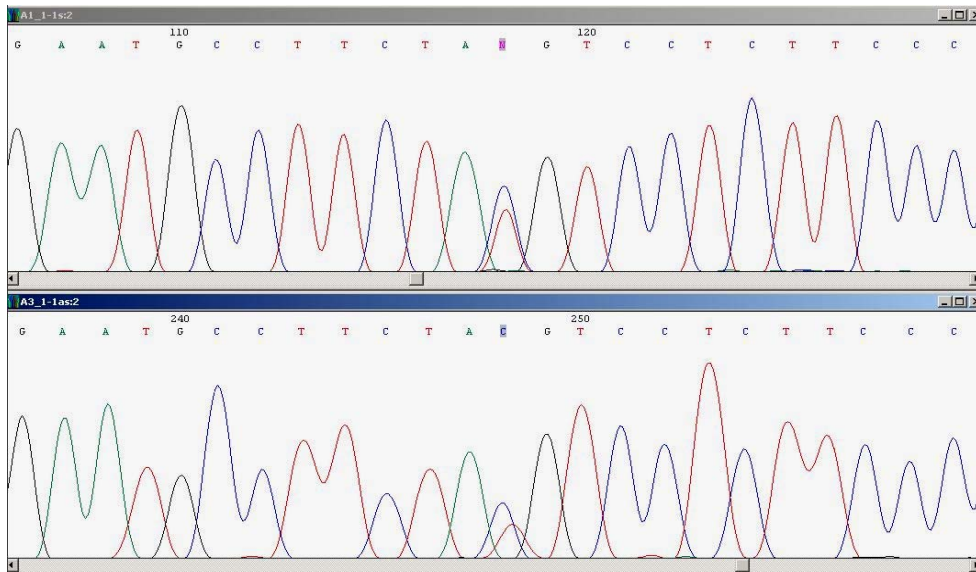
Eletroferogramas do exon 5 do paciente 10, mostrando a mutação Q347X em homozigose nas fitas “direta” e “inversa”.



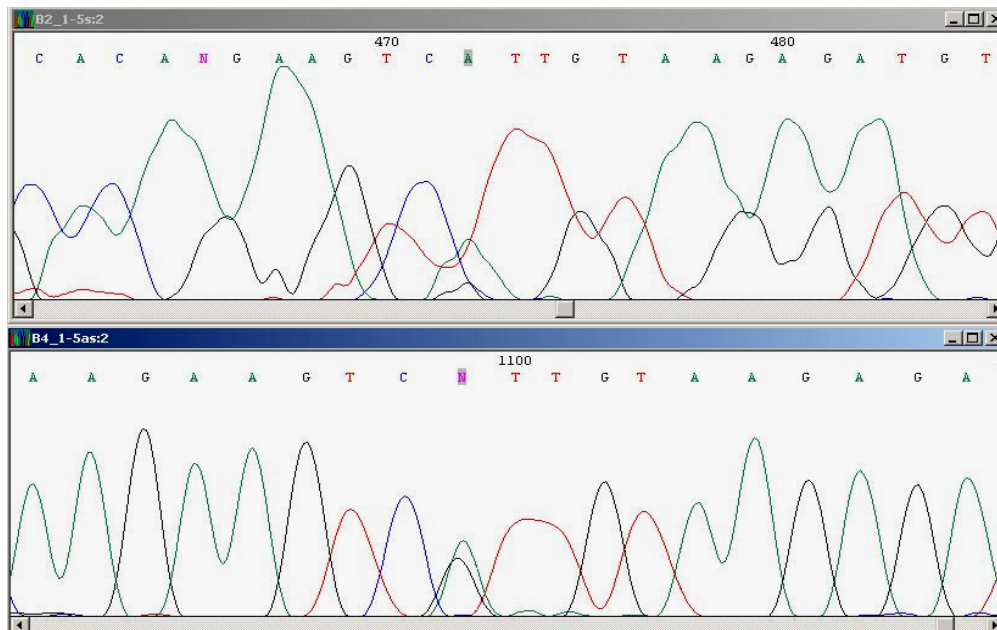
Eletroferogramas do exon 5 do paciente 5, mostrando a mutação Q347X em heterozigose nas fitas “direta” e “inversa”.



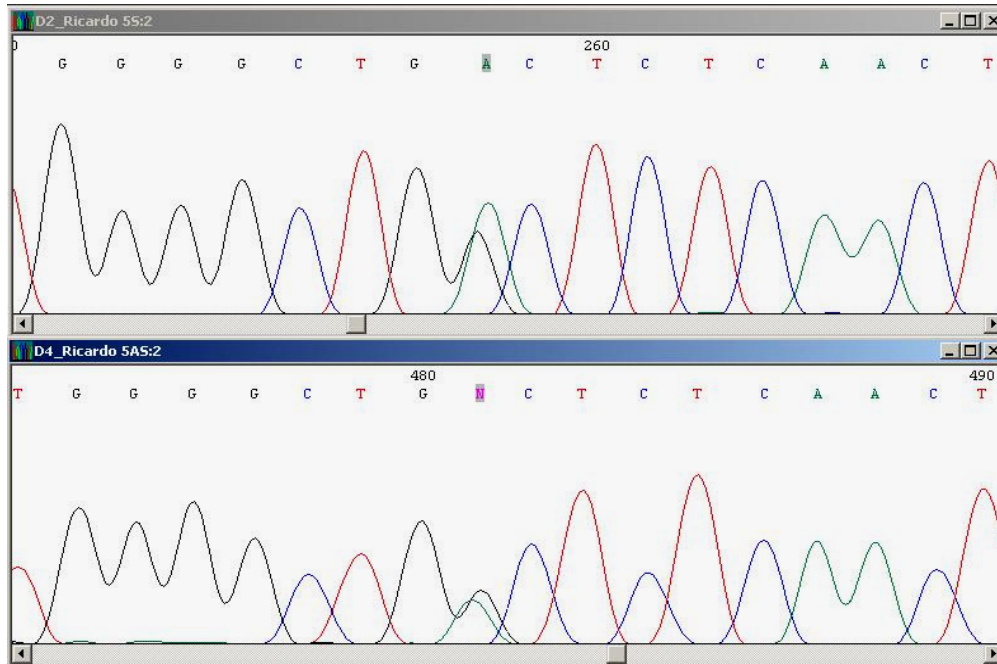
Eletroferogramas do exon 1 do paciente 13, mostrando a mutação silenciosa Y44Y (TAC-TAT) em heterozigose nas fitas “direta” e “inversa”..



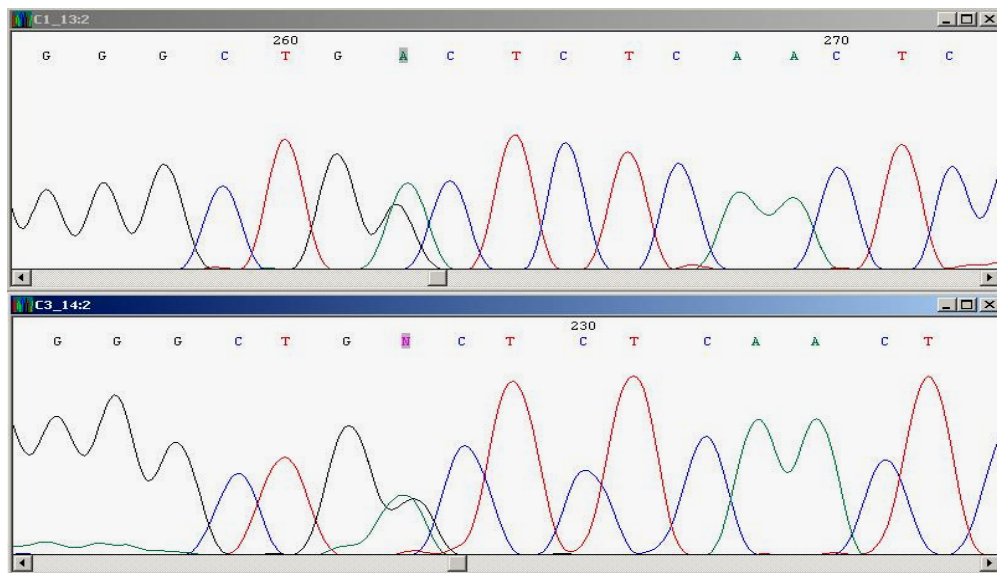
Eletroferogramas do exon 5 do paciente 13, mostrando a mutação silenciosa S356S (TCG-TCA) em heterozigose nas fitas “direta” e “inversa”..



Eletroferogramas do exon 5 do paciente 9, mostrando a mutação nova A274T (GCT-ACT) em heterozigose nas fitas “direta” e “inversa”..



Eletroferogramas do exon 5 do paciente 7, mostrando a mutação nova A274T (GCT-ACT) em heterozigose nas fitas “direta” e “inversa”..



9. RESUMO

A glicogenose tipo Ia é uma doença autossômica recessiva causada pela deficiência da glicose-6-fosfatase (G6Pase). A glicogenose tipo Ia é caracterizada pela ocorrência de hepatomegalia, hipoglicemia de jejum, acidose láctica, hiperuricemia, hiperlipidemia e baixa estatura. O gene que codifica a G6Pase está localizado no braço longo do cromossomo 17 na região q21. O gene tem 12,5 kb e apresenta 5 exons que codificam uma proteína hidrofóbica de 357 aminoácidos. Desde a identificação do gene G6PC, 85 mutações foram descritas. Usando amostras de sangue armazenadas em papel filtro (FTA), foi realizado o sequenciamento genético em 16 pacientes de 14 diferentes famílias.

Quatro mutações conhecidas R83C, Q347X, Q54P, G188R, e uma nova mutação A274T foram encontradas. As mutações R83C e Q347X e a nova mutação A274T foram confirmadas por análise de restrição. As 2 mutações mais encontradas foram R83C e Q347X, em 13 de um total de 28 alelos mutantes (46,42%). A nova mutação A274T (GCT→ACT) foi identificada em 3 pacientes de 2 famílias diferentes. Os pais não eram consangüíneos e os pacientes eram heterozigotos compostos para a nova mutação e a mutação R83C. A nova mutação não foi identificada em 100 alelos de indivíduos normais. A análise de mutação é uma boa alternativa à mensuração da atividade enzimática, pois, pode ser realizada usando amostras de sangue, evitando procedimentos invasivos como as biópsia hepáticas. O estudo contribui para o diagnóstico molecular dos pacientes no Brasil e contribuirá com o banco de dados internacional sobre mutações da Glicogenose. Ia

10. Abstract

Type Ia glycogen storage disease (GSD1a) is an autosomal recessive metabolic disorder caused by a deficiency in glucose-6-phosphatase (G6Pase). GSD Ia is characterized by hepatomegaly, fasting hypoglycemia, lactic acidemia, hyperuricemia, hyperlipidemia and short stature (Chen 2001). The G6Pase gene is located in the long arm of chromosome 17 q21 region. It spans 12.5 kb and consist of five exons and encodes a hydrophobic protein of 357 aminoacids. Since the cloning of the gene encoding G6Pase, 85 mutations have been reported (HGMD 2006). Using blood samples stored in “FTA Gene Card” we performed DNA sequencing which characterized the G6Pase gene of 16 patients, from 14 unrelated families. Four known mutations, R83C, Q347X, Q54P, G188R and a novel mutation A274T were found. The mutations R83C, Q347X and the novel mutation A274T were also confirmed by restriction analyses. The two most common mutations identified were R83C and Q347X, accounting for 13 of 28 (46.42%) mutant alleles. A new mutation A274T (GCT→ACT) was identified in 3 patients of 2 unrelated families. The parents are not consanguineous and the patients are compound heterozygotes to R83C and a novel mutation A274T. The new mutation was not detected in 100 alleles from normal individuals. The mutation analysis is a good alternative to enzyme assay because can be performed using blood samples, avoiding invasive procedures as liver biopsy. Our findings will be helpful to DNA based-diagnosis in Brazilian patients, and it contributes to the international data about GSD Ia mutations.

11. APÊNDICE

Mutações do gene G6PC

| PRIMERS | REGIÃO CODIFICADORA | CÓDON INICIADOR E DE "STOP" | SEQUENCIA GENÔMICAS E INTRÔNICAS ADJACENTES | Mutações |
|---------|---------------------|-----------------------------|---|----------|
|---------|---------------------|-----------------------------|---|----------|

EXON 1 309 bp

TAGCAGAGCAATCACCACCAAGCCTGGAATAACTGCAAGGGC [**TCTGCTGACATC**
TTCTTGAGGTGCCAAGGAAATGAGG**ATG**GAGGAAGGAA**TGAAT**GTTCTCCATGAC
TTTGGGATCCAGTCA**A**CACATTACCTCC**A**GGTGAATTAC**CA**AAGACTCC**C**AGGACT
GGTTCATCTT**GG**TGTCCGTGATCGCAG**A**CCTCAGGAATGCCTTCTACGTCTCTT
CCCCATCT**GGT**TCCATCTT**C**AGGAAGCTGTGGGCATTAAACTCCTT**TGG**GTAG**G**CT
GTGATT**GG**GAGACT**GG**CTCAACCTCGTCTTTAA**GTG**gta**aga**accatata**gagagag**
agaTCAGCAAGAAAAGAGGC] tggcattcgctctcgcaatgtctgtccatcagaa
gttgctttcccaggctattcaggaagccagggctactcatgcttccaaccct
ctctctgactttggatcatctacataaagggggaagacagaaaaatccta

EXON 2 110 bp

ttacatacataaggaagtgtcatgaaatctccctctcacacttctcccagcc
accagttctccctctagaggcaacatgtgaaatccttctcaggctacactctt
cttgaaggtgtaggctttgggcaaaa [**GCATTCATTCAGTAACCC**cagaaacttg
ttctgtttttccata**G**ATTCTCTTT**G**GACAG**CG**TCCATACTGGTG**G**GTTTTGGA
TACTGACTACTACAGCAACACTTCCGTGCCCTGATAAAG**C**AGTTCCTGTAA**CC**
TGT**G**AGACT**G**GAC**C**AGgtaagcgtcccagccctgc**AGACAGAAGCTGAGTGG**] a
cctcgtttacctgttatggatgaaactgaccttgaggggacatgaggagagccat
tcctttgtacttttgtcatgctcttcaattggcacaataattcacttctgcaa
tactttcctgaatagcacagtagtattggaaa

EXON 3 106 bp

aacgaatggatggtaagatgggtggatggatggggggtgaacggatggatggggg
gtgaatggatggatgaatgggtagatgggtggatagggggatggctgggtggctg
ggtagatgatgcactgtctccagatgaggacctttt [**CACCTTTACTCCATTCT**
Ctttctgccccttag**GG**GAGCCCCTCT**GG**CC**A**TGCCATGG**G**CACAG**G**CAGGTGTAT
ACTACGTGATGGTCACATCTACTCTTTCCATCTTT**C**AGGGAAAGATAAAGCC**G**AC
CTAC**A**GATTT**CG**gtaagaactcaccactgggggtgtaggtggtggagggcaggagg
cagctctctc**TGTAGCTGACACACCAC**] gtattcttctcacatccccctagccc
gctcccacacctgggcagccgctgattaagagttgtggcacttggatagggata
aacctcagagtcaggaatggttgggct

[mm1] Comentário: M5R-ATG-AGG

[mm2] Comentário: 97insTGAA

[mm3] Comentário: T16A-ACA-GCA

[mm4] Comentário: Q20R-CAG-CGG

[mm5] Comentário: Q24X-CAA-TAA

[mm6] Comentário: 158delC

[mm7] Comentário: 175delGG

[mm8] Comentário: D38V-GAG-GTC

[mm9] Comentário: W50X-TGG-TAG

[mm10] Comentário: 229 delGT

[mm11] Comentário: Q54P-CAG-CCG

[mm12] Comentário: W63R-TGG-CGG

[mm13] Comentário: W63X-TGG-TGA

[mm14] Comentário: A65P-GCT-CCT

[mm15] Comentário: ... [1]

[mm16] Comentário: ... [2]

[mm17] Comentário: ... [3]

[mm18] Comentário: ... [4]

[mm19] Comentário: ... [5]

[m20] Comentário: 30 ... [6]

[m21] Comentário: Sp ... [7]

[mm22] Comentário: ... [8]

[mm23] Comentário: ... [9]

[mm24] Comentário: ... [10]

[mm25] Comentário: ... [11]

[mm26] Comentário: ... [12]

[mm27] Comentário: ... [13]

[mm28] Comentário: ... [14]

[mm29] Comentário: ... [15]

[mm30R29] Comentário: ... [16]

[mm31] Comentário: ... [17]

[mm32] Comentário: ... [18]

[mm33] Comentário: ... [19]

[mm34] Comentário: ... [20]

[mm35] Comentário: ... [21]

[mm36] Comentário: ... [22]

[mm37] Comentário: ... [23]

[mm38] Comentário: ... [24]

EXON 4 116 bp

tctgagccgctgcacccagcccccaacaggcatctttggacttttgagtactggc
 ttaatttacaaaaattcactgagagcacctaagttt [GCCAGGCTCCAACATT
 Tctgcaggggctgttttctttgctgaaggatctgcacctgttctgttatgggt
 gcctcttctgttgcagGTGCTTGAATGTCA~~TTTTGT~~GTTGGGATTCTGGGCTGT
 GCAGCTGAATG~~TCTGTCTGTCA~~CGAATCTA~~CCTTGCTGCTCATT~~~~TTCTCAT~~CAA
 GTTGTGCTG~~GAGTCCGTGCA~~Ggtatgggctgatctgactccctccttctcccc
 caaaccCCATTCCGTTTCTCTCC] ctaatcaggacaaaatccagcattccagcc
 acatcctgtgtgtaatcagtactgttagcatttctgtgggttgaaagtcaagaat
 gagcaacttgaatgattaatttctataagagtgccca

[mm39] Comentário: 540 del
TTTTG

[mm40] Comentário: W156L
-TGG-TTG

[mm41] Comentário: V166A
GTC-GCC

[mm42] Comentário: V166G
GTC-GCC

[mm43] Comentário: R170X
CGA-TGA

[mm44] Comentário: R170Q
CGA-CAA

[mm45] Comentário: Y172X
TAC-TAA

[mm46] Comentário: F177C
TTT-TGT

[mm47] Comentário: P178S
CCT-TCT

[mm48] Comentário: H179P
CAT-CTC

[mm49] Comentário: 616del
T

[mm50] Comentário: G184E
GGA-GAA

[mm51] Comentário: G184V
GGA-GTA

[mm52] Comentário: G188R
GGC-CGC

[mm53R52] Comentário: G1
88S-GGC-AGC

[m54] Comentário: Splicing
+1 G→A

EXON 5 2455 bp

tatattgagggcaggctggagtcacacatgggaataagccaggcgaccctcccatctgcatctgtgatttaatt
 ccacagtcgcagaacggatggcatgtcaccactcctccaaaccacctctagcaaaaggtcccaaatc [CTTCC
 TATCTCTCACAGTcatgctttcttccactcagGCATTGCTGTTGCAGAACTTTCAGCCACATCCACAGCATCTA
 TAATGCCAGCCTCAAGAAATATTTTCATTACCTTCTTCTCTTCAGCTTCGCCATCGGATTTATCTGCTGCT
 CAAGGGACTGGGTGTAGACCTCTGTGGACTCTGGAGAAAGCCAGAGGTGGTGGAGCAGCCAGAATGGGTCCA
 ATTGACACACACCTTTGCCAGCCTCCTCAAGAACTGGGCACGCTCTTTGGCCTGGGGCTGCTCTCAACTC
 CAGCATGTACAGGGAGCTGCAAGGGGAACTCAGCAAGTGGCTCCATTCCGCCTCAGCTCTATTGTAGCCTC
 CCTCGTCTCTGCACGCTTTGACTCCTTGAACCCCATCCCAAGTCGAGCTGGTCTTCTACGTCTTGTCCTT
 CTGCAAGAGTGGGTAGTGCCCTGGCATCCGTCAGTGTCAATCCCTACTGCCCTGCCAGGTCCTGGGCCAGCC
 GCACAAGAAGTCGTTGTAAAGATGTGGAGTCTTCGGTGTTTAAAGTCAACAACCATGCCAGGGATTGAGGAGGA
 CTACTATTTGAAGCAATGGGCACTGGTATTTGGAGCAAGTGA] CATGCCATCCATTCTGCCGTCGTGGAATTA
 ATCACGGATGGCAGATTGGAGGGTGCCTGGCTTATCCCATGTGTGACTCCAGCCTGCCCTCAGCACAGACTCT
 TTCAGATGGAGGTGCCATATACGTACACCATATGCAAGTTTCCCGCAGGAGTCTCCTCTCTACTTGAAT
 ACTCTCACAAGTAGGGAGCTCACTCCCACTGGAACAGCCCATTTTATCTTTGAATGGTCTTCTGCCAGCCATTT
 TGAGGCCAGAGGTGCTGTACGCTCAGGTGGTCTCTTTTACAATCCTAATCATATTGGGTAATGTTTTTGA
 CTAATGAAGCTATTGAGAAAGACCTGTTGCTAGAAGTTGGGTTGTTCTGGATTTTCCCTGAAGACTTACTTATT
 CTTCCGTCACATATACAAAAGCAAGACTTCCAGGTAGGGCCAGCTCACAAGCCAGGCTGGAGATCCTAACTGAG
 AATTTCTACCTGTGTTCACTTACCAGAAAAGGAGAAAGGAGCTCTGAATCTGATAGGAAAAGAAGGCTGCC
 TAAGGAGGAGTTTTTAGTATGTGGCGTATCATGCAAGTGTATGCCAAGCCATGTCTAAATGGCTTTAATTATAT
 AGTAATGCACTCTCAGTAATGGGGACCAGCTTAAGTATAATTAATAGATGGTTAGTGGGGTAATCTGCTCTA
 GTATTTTTTTACTGTGCATACATGTTTATCGTATTTCTTGGATTTCTGAATGGTGCAGTGACCCAGATATTG
 CACTAGGTCAAAACATTCAGGTATAGCTGACATCTCCTCTATCACATTACATCATCTCCTTATAAGCCCAGCTC
 TGCTTTTTCCAGATTTTCCACTGGCTCCACATCCACCCACTGGATCTTCAGAAGGCTAGAGGGCGACTCTGGT
 GGTGCTTTTGTATGTTTCAATTAGGCTCTGAAATCTTGGGCAAAATGACAAGGGGAGGGCCAGGATTCTCTCTC
 AGGTCACCTCAGTGTACTTTTAAATCTTAGAGGGTAAATATGACTCCTTTCTCTATCCCAAGCCAACCAAGAGC
 ACATCTTAAAGGAAAAGTCAACATCTTCTCTTTTTTTTTTTTTTTTGGAGCAGGCTCACTATGTTGCCAG
 GCTGCTCTGAATCCTGGGCTCAAGCAGTCTCCACCCTACCACAGCGTCCCGCTAGCTGGGACTACAGGTG
 CAAGCCACTATGTCCAGCTAGCCAACTCCTCTGCTGCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGGAGCAGGCGCACCC
 TATCACCCAGGCTGGAGTGGAGTGGCAGCATCTTGGCTCAGTGAACCTCTTCTCTGTTCAAGCGATTCTCA
 TGCTCAGCCTCCTCAGTAGCTAGGACTACGGCGTGCACCACCATGCCAGGCTAATTTTTATATTTTTTAGAAT
 TTAGAAGAGATGGGATTTTATCATGTTGGCCAGGCTGGTCTCGAACTCCTGACCTCAAGTGATCCACCTGCCTTG
 GCCTCCCAAGGTGCTAGGATTACAGGCATGAGCCACCGCACGGGCCCCCTTGCCTGTTTTTCAATCTCATCTG
 ATATGCAGAGTATTTCTGCCCCACCCACCTACCCCCAAAAAAGCTGAAGCCTATTTATTGAAAGTCTCTGTT
 TTTGCTACTAATTATATAGTATACCATACATTATCATTCAAAACAACCATCTGCTCATAACATCTTTGAAAAGA
 AAAATATATATGTGCAGTATTTTATTAAGCAACATTTTATTTAAGAATAAAGTCTTGTTAATTACTATATTTA
 GATGCAATGTGATCTgaagtttctaatctggcccaactaaattctctagctctgtttccctaacaacaataattg
 gtttctctgtgctgcattttcccttgggagaagaaagtctctctcttgagttgaccgagagtcatttaggg
 atagggagacttaaatgcatccacaggggacagggcagagtga

[mm55] Comentário: Y209C-TAT-TGT

[mm56] Comentário: L211P-CTC-CCC

[m57] Comentário: Splicing +86 G→T

[mm58] Comentário: G222R-GGA-AGA

[mm59R58] Comentário: G222R-GGA-CGA

[mm60] Comentário: W236R-TGG-AGG

[mm61] Comentário: 794del G

[mm62] Comentário: A241T-GCC-ACC

[mm63] Comentário: Q242X-CAG-TAG

[mm64] Comentário: 813ins G

[mm65] Comentário: 244-indel-CGAGCAGC--GCGAGCAG

[mm66] Comentário: 836del A

[mm67] Comentário: T255I-ACC-ATC

[mm68] Comentário: P257L-CCC-CTC

[mm69] Comentário: 867del A

[mm70] Comentário: N264K-AAC-AAA

[mm71] Comentário: 872del C

[mm72] Comentário: L265P-CTG-CCG

[mm73] Comentário: G266V-GGC-GTC

[mm74] Comentário: G270R-GGC-CGC

[mm75] Comentário: G270V-GGC-GTC

[m76] Comentário: Nova Mutação: A274T GCT-ACT

[mm77] Comentário: 932ins AA

[mm78] Comentário: R295C-CGC-TGC

[mm79] Comentário: ... [25]

[mm80] Comentário: ... [26]

[mm81] Comentário: ... [27]

[mm82] Comentário: ... [28]

[mm83] Comentário: ... [29]

[mm84] Comentário: ... [30]

[mm85] Comentário: ... [31]

| | | |
|--------------------------------------|--------------|--------------------|
| Página 77: [1] [mm15] Comentário | Marcelo Mori | 15/1/2008 16:40:00 |
| G68R-GGA-AGA | | |
| Página 77: [2] [mm16] Comentário | Marcelo Mori | 15/1/2008 16:40:00 |
| W70X-TGG-TAG | | |
| Página 77: [3] [mm17] Comentário | Marcelo Mori | 15/1/2008 16:40:00 |
| W70X-TGG-TGA | | |
| Página 77: [4] [mm18] Comentário | Marcelo Mori | 15/1/2008 16:40:00 |
| K76N-AAG-AAC | | |
| Página 77: [5] [mm19] Comentário | Marcelo Mori | 15/1/2008 16:40:00 |
| W77R-TGG-CGG | | |
| Página 77: [6] [m20] Comentário | mmlifebook | 15/1/2008 16:40:00 |
| 309+4A→G splicing | | |
| Página 77: [7] [m21] Comentário | mmlifebook | 15/1/2008 16:40:00 |
| Splicing:-1 G→A | | |
| Página 77: [8] [mm22] Comentário | Marcelo Mori | 15/1/2008 16:40:00 |
| G81R-GGA-AGA | | |
| Página 77: [9] [mm23] Comentário | Marcelo Mori | 15/1/2008 16:40:00 |
| G81R-GGA-CGA | | |
| Página 77: [10] [mm24] Comentário | Marcelo Mori | 15/1/2008 16:40:00 |
| R83C-CGT-TGT | | |
| Página 77: [11] [mm25] Comentário | Marcelo Mori | 15/1/2008 16:40:00 |
| R83H-CGT-CAT | | |
| Página 77: [12] [mm26] Comentário | Marcelo Mori | 15/1/2008 16:40:00 |
| 340delG | | |
| Página 77: [13] [mm27] Comentário | Marcelo Mori | 15/1/2008 16:40:00 |
| Q104X-CAG-TAG | | |
| Página 77: [14] [mm28] Comentário | Marcelo Mori | 15/1/2008 16:40:00 |
| T108I-ACC-ATC | | |
| Página 77: [15] [mm29] Comentário | Marcelo Mori | 15/1/2008 16:40:00 |
| G110Q-GAG-CAG | | |
| Página 77: [16] [mm30R29] Comentário | Marcelo Mori | 15/1/2008 16:40:00 |
| G110K-GAG-AAG | | |
| Página 77: [17] [mm31] Comentário | Marcelo Mori | 15/1/2008 16:40:00 |
| T111I-ACT-ATT | | |
| Página 77: [18] [mm32] Comentário | Marcelo Mori | 15/1/2008 16:40:00 |
| P113L-CCA-CTA | | |
| Página 77: [19] [mm33] Comentário | Marcelo Mori | 15/1/2008 16:40:00 |
| G118R-GGC-CGC | | |
| Página 77: [20] [mm34] Comentário | Marcelo Mori | 15/1/2008 16:40:00 |
| H119L-CAT-CTT | | |
| Página 77: [21] [mm35] Comentário | Marcelo Mori | 15/1/2008 16:40:00 |
| G122D-GGC-GAC | | |
| Página 77: [22] [mm36] Comentário | Marcelo Mori | 15/1/2008 16:40:00 |
| A124T-GCA-ACA | | |
| Página 77: [23] [mm37] Comentário | Marcelo Mori | 15/1/2008 16:40:00 |
| 459insTA | | |
| Página 77: [24] [mm38] Comentário | Marcelo Mori | 15/1/2008 16:40:00 |
| 518indel-A--- TG) | | |
| Página 79: [25] [mm79] Comentário | Marcelo Mori | 15/1/2008 16:40:00 |

S298P-TCT-CCT

| | | |
|-----------------------------------|--------------|--------------------|
| Página 79: [26] [mm80] Comentario | Marcelo Mori | 15/1/2008 16:40:00 |
|-----------------------------------|--------------|--------------------|

F322L-TTC-CTC

| | | |
|-----------------------------------|--------------|--------------------|
| Página 79: [27] [mm81] Comentario | Marcelo Mori | 15/1/2008 16:40:00 |
|-----------------------------------|--------------|--------------------|

1058delTCC

| | | |
|-----------------------------------|--------------|--------------------|
| Página 79: [28] [mm82] Comentario | Marcelo Mori | 15/1/2008 16:40:00 |
|-----------------------------------|--------------|--------------------|

V388F-GTC-TTC

| | | |
|-----------------------------------|--------------|--------------------|
| Página 79: [29] [mm83] Comentario | Marcelo Mori | 15/1/2008 16:40:00 |
|-----------------------------------|--------------|--------------------|

I341N-ATC-AAC

| | | |
|-----------------------------------|--------------|--------------------|
| Página 79: [30] [mm84] Comentario | Marcelo Mori | 15/1/2008 16:40:00 |
|-----------------------------------|--------------|--------------------|

344-indel-tc-ga

| | | |
|-----------------------------------|--------------|--------------------|
| Página 79: [31] [mm85] Comentario | Marcelo Mori | 15/1/2008 16:40:00 |
|-----------------------------------|--------------|--------------------|

Q347X-CAG-TAG

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)