

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: BIOQUÍMICA

DETECÇÃO DE CINCO NOVAS MUTAÇÕES EM PACIENTES  
BRASILEIROS COM GANGLIOSIDOSE GM1

MATHEUS BARBOSA VIEIRA

ORIENTADORA: JANICE CARNEIRO COELHO

Porto Alegre - RS  
2006

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: BIOQUÍMICA

DETECÇÃO DE CINCO NOVAS MUTAÇÕES EM PACIENTES  
BRASILEIROS COM GANGLIOSIDOSE GM1

MATHEUS BARBOSA VIEIRA

*Dissertação submetida ao Programa  
de Pós-Graduação em Bioquímica da  
Universidade Federal do Rio Grande  
do Sul como requisito parcial para a  
obtenção do grau de Mestre*

ORIENTADORA: JANICE CARNEIRO COELHO

Porto Alegre - RS  
2006

## AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Janice Carneiro Coelho, minha orientadora e amiga, pela confiança, competência e pelo companheirismo nestes seis anos nos quais trabalhamos juntos.

À Dra. Ursula Matte, minha Co-orientadora, pelo profissionalismo e pela gentileza de abrir as portas do Laboratório de Terapia Gênica e acolher-me com tanto louvor. Um agradecimento especial a cada minuto do tempo que dedicou ao nosso projeto de pesquisa.

Ao Dr. Roberto Giugliani, pelo caráter, espírito de liderança e serenidade, os quais eu admiro muito e terei sempre como exemplo de profissional competente e dedicado. Um agradecimento especial pela oportunidade que me proporcionou de fazer um estágio nos Estados Unidos, o qual foi extremamente útil para meu processo de aprendizado.

A Mariana Goldim, minha bolsista, a quem eu agradeço de forma especial, pois ela certamente foi a peça fundamental para que este trabalho fosse concluído. Pela competência profissional, dinamismo e habilidade, o meu  
RECONHECIMENTO!

À Renata Sano, que literalmente me incentivou a trabalhar com pesquisa, pela extrema dedicação e seriedade em todos os momentos.

Aos Meus Pais, Antonio do Carmo e Jeanete Vieira, pessoas SINGULARES as quais eu agradeço e dedico cada conquista de minha vida e a minha irmã, Graziela Vieira pelo companheirismo e pela forte amizade.

Ao Dr. Shunji Tomatsuo, pesquisador da Saint Louis University (USA) pela oportunidade de trabalhar em seu grupo.

A minha namorada, Paola, pelo companheirismo e pelo incentivo em todas as minhas conquistas.

***"Você nunca saberá o que é suficiente a  
não ser que saiba o que é mais do que o  
suficiente."***

*(William Blake)*

## RESUMO

A Gangliosidose GM1 é um Erro Inato do Metabolismo (EIM) causado pela deficiência da enzima  $\beta$ -galactosidase ácida. Essa doença é caracterizada pelo acúmulo de metabólitos não degradados, principalmente gangliosídeo GM1, nos lisossomos de vários tipos celulares. Baseado na idade de início e na atividade residual da enzima, a Gangliosidose GM1 é classificada em três diferentes tipos: infantil, juvenil e adulto. O gene da  $\beta$ -galactosidase ácida (GLB1, GeneBank M27507) está situado no cromossomo 3 e possui mais de 60 kb, contendo 16 exons. Cerca de 50 mutações associadas à doença estão descritas na literatura. No sul do Brasil, há uma alta frequência dessa doença (1:17.000 nascidos vivos). Neste trabalho, vinte pacientes diagnosticados no Hospital de Clínicas de Porto Alegre (Brasil) tiveram o gene GLB1 investigado por SSCP (Single Strand Conformational Polymorphism) usando DNA extraído de sangue periférico. Através desta triagem foram encontradas 52 alterações de mobilidade do DNA, indicando a presença de mutações. As amostras relativas aos exons 2 e 15 foram submetidas a sequenciamento direto com seqüenciador ABI310 (Applied Biosystems) utilizando kit BigDye 3.1. Cinco novas mutações no gene GLB1 (F63Y, R38G, Y36S, Y64F e R59C) e duas mutações já descritas (R59H e 1622-1627insG) foram encontradas. Este trabalho possibilitou a genotipagem completa de 6 pacientes e parcial de 5, e direcionou a investigação de mutações, contribuindo diretamente no diagnóstico da enfermidade e permitindo a realização de estudos de correlação genótipo/fenótipo destes pacientes.

## ABSTRACT

GM1 Gangliosidosis is a lysosomal storage disease caused by  $\beta$ -galactosidase deficiency. As a result of this defect there is a huge accumulation of GM1 ganglioside in tissues of affected patients. Gangliosides are glycosphingolipids present in high concentration in neural tissues. The localization of these lipids explain in part the neurodegeneration present in patients. The  $\beta$ -galactosidase gene (GLB1-Gene Bank M27507) is located on chromosome 3 and spans more than 60 kb and it is formed by 16 exons. Over than 45 mutations were found in this gene up to now. In southern Brazil the high frequency of GM1 Gangliosidosis (1:17.000 live born) justify the aim of this work, that is to genotype those patients with GM1 Gangliosidosis, by, first screening they DNA by SSCP (Single Strand Conformational Polimorphism) and than, sequencing in automated apparatus. The screening of 16 exons from 20 patients gave us the information that 52 mobility changes of DNA Single Strand were found, suggesting possibility of mutations. Samples from exons 2 and 15 were submitted to direct sequencing in ABI310 (Applied Biosystems) using Big Dye3.1 terminator Kit. Five new mutations were found in GLB1 gene (F63Y, R38G, Y36S, Y64F and R59C) and two mutations described previously (R59H and 1627insG). This investigation gave support to complete genotype 6 patients with GM1 Gangliosidosis, partial genotype 5 patients and gave a good support for future analysis in GLB1 gene to correlate genotype and phenotype easily.



## LISTA DE SÍMBOLOS

ABREVIATURA	SÍMBOLO	NOME DO AMINOÁCIDO
Ala	A	Alanina
Asx	B	Asparagina ou Aspartato
Cis ou Cys	C	Cisteína
Asp	D	Aspartato (Ácido aspartico)
Glu	E	Glutamato (Ácido glutâmico)
Fen ou Phe	F	Fenilalanina
Gli ou Gly	G	Glicina
His	H	Histidina
Ile	I	Isoleucina
Lis ou Lys	K	Lisina
Leu	L	Leucina
Met	M	Metionina
Asn	N	Asparagina
Pro	P	Prolina
Gln	Q	Glutamina (Glutamida)
Arg	R	Arginina
Ser	S	Serina
Tre ou Thr	T	Treonina
Val	V	Valina
Trp	W	Triptofano (Triptofana)
Tir ou Tyr	Y	Tirosina
Glx	Z	Glutamina ou Glutamato

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>ABREVIATURA</b>	<b>SIGNIFICADO</b>
SSCP	Single Strand Conformational Polimorphysm
DLs	Doenças Lisossômicas
EIM	Erro Inato do Metabolismo

## LISTA DE TABELAS

TABELA	TÍTULO	Pág.
01	Resumo das características clínicas da Gangliosidose GM1 modificado de Suzuki e colaboradores, 1995.	14
02	Mutações de ponto no Gene da $\beta$ -galactosidase ácida Humana	19
03	Oligonucleotídeos (primers) utilizados nas Reações de PCR (Baiotto et al 2001)	25
04	Análise das alterações de migração da fita simples de DNA em gel de Poliacrilamida nos diferentes exons por paciente	31
05	Alterações de migração da fita simples de DNA – SSCP em cada exon na população estudada.	32
06	Alteração provocada no DNA genômico dos pacientes cujas 5 novas mutações foram identificadas.	35
07	Status de investigação do genótipo dos 15 pacientes: Antes e Depois do presente trabalho	36

## LISTA DE FIGURAS

TABELA	TÍTULO	Pág.
01	Catabolismo de esfingolipídeos em doenças lisossômicas. Adaptado de Nelson et. al., 1992	8
02	Mutações no gene da $\beta$ -galactosidase ácida (Callahan, 1999)	18
03	Análise do produto da PCR em gel de agarose 1,5%	28
04	Padronização de SSCP	29
05	SSCP do Exon 2	33
06	SSCP do Exon 15	34
07	Cromatograma das cinco mutações novas identificadas. F63Y, R38G, Y36S, Y64F e R59C.	37
08	Comparação da seqüência de aminoácidos da $\beta$ -galactosidase ácida em diferentes espécies	40

## SUMÁRIO

RESUMO .....	V
ABSTRACT.....	VI
LISTA DE SÍMBOLOS .....	VII
LISTA DE ABREVIATURAS .....	VIII
LISTA DE TABELAS.....	IX
LISTA DE FIGURAS.....	X
1 INTRODUÇÃO.....	2
1.1 ERROS INATOS DO METABOLISMO .....	2
1.2 ENZIMAS LISSOSSÔMICAS.....	3
1.3 DOENÇAS LISSOSSÔMICAS.....	6
1.4 GANGLIOSIDOSE GM1.....	10
2 OBJETIVOS.....	23
3 MATERIAL E MÉTODO.....	24
3.1 PACIENTES .....	24
3.2 PREPARAÇÃO DO DNA E AMPLIFICAÇÃO – REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR).....	24
3.3 POLIMORFISMO CONFORMACIONAL DE FITA SIMPLES (SSCP).....	25
3.4 SEQUENCIAMENTO AUTOMATIZADO .....	26
5 DISCUSSÃO.....	38
6 CONCLUSÕES.....	44
7 REFERÊNCIAS BIBLOGRÁRICAS .....	46

## **1 INTRODUÇÃO**

### **1.1 ERROS INATOS DO METABOLISMO**

Os Erros Inatos do Metabolismo (EIM) formam um grupo heterogêneo de doenças originadas a partir de uma alteração no material genético, que determina o defeito ou a ausência de uma proteína, geralmente uma enzima, prejudicando a função metabólica (Cohn e Roth 1983; Jorde et. al., 2000).

Os EIM são doenças monogênicas, de herança autossômica recessiva em sua maioria. A alteração em um gene produz um defeito enzimático, que leva às alterações bioquímicas características de cada doença, comprometendo os processos metabólicos responsáveis pelo funcionamento normal de um organismo (Jimenez e Shchuchman 2003).

A maioria dos EIM se manifesta na idade pediátrica, desde as primeiras horas de vida até a adolescência. Apresentam sinais e sintomas similares a outras doenças, dificultando o diagnóstico clínico preciso e precoce. Apesar de raros individualmente, em conjunto esses distúrbios metabólicos contribuem com uma porcentagem substancial de morbidade e mortalidade diretamente atribuídas às doenças genéticas (Jorde et al., 2000; Jimenez e Shchuchman 2003).

## 1.2 ENZIMAS LISSOSSÔMICAS

Os lisossomos são componentes básicos do trato digestivo intracelular. Eles contêm um conjunto de enzimas hidrolíticas que apresentam duas propriedades especiais: primeiro, elas podem funcionar no meio ácido dos lisossomos e, segundo, estas enzimas constituem uma categoria especial de proteínas secretoras, que são destinadas para o interior desta organela intracelular (Knop et al., 1993).

São conhecidos em torno de 70 enzimas lisossômicas diferentes. A maioria delas atua na porção terminal de um substrato complexo, funcionando de maneira seqüencial para liberar unidades monoméricas que podem difundir para fora do lisossomo ou servir de substrato para uma próxima reação enzimática, formando uma reação em cascata. Estes substratos podem ser derivados da reposição metabólica das organelas intracelulares (autofagia) ou serem adquiridos do exterior das células por fagocitose (heterofagia).

As enzimas lisossômicas passam por uma série de modificações pós-traducionais durante seus processos de maturação para alcançar uma forma enzimática funcional ativa dentro do lisossomo (Hasilik et al., 1980; Kornfeld et al. 1989).

Durante os últimos 20 anos, intensos estudos têm sido feitos na tentativa de definir estas modificações e isto tem contribuído muito para a elucidação dos defeitos nas desordens lisossomais. A maioria das enzimas lisossômicas é sintetizada como precursores de alto peso molecular, que apresentam uma seqüência sinal N-Terminal característica que as direciona para o interior do retículo endoplasmático (Blobel, 1987; Gieselmann, 1995; Kim e Arvan, 1998)

As proteínas com estas seqüências sinalizadoras são sintetizadas nos ribossomos ligados ao retículo endoplasmático. A própria seqüência sinalizadora é um instrumento no direcionamento do ribossomo ao retículo endoplasmático. A seqüência sinalizadora aparece cedo no processo de síntese, porque ela está no grupo amino terminal (Bachmair et al., 1986). À medida que a enzima deixa o ribossomo, esta seqüência e o próprio ribossomo são rapidamente ligados por um grande complexo chamado partícula de reconhecimento de sinal. Este evento de ligação interrompe o alongamento quando o peptídeo tiver cerca de 70 aminoácidos de comprimento e a seqüência sinalizadora tenha saído completamente do ribossomo. A partícula de reconhecimento de sinal ligada direciona o ribossomo com o polipeptídeo incompleto para um conjunto específico de receptores na fase citosólica do retículo endoplasmático. Logo, a partícula de reconhecimento de sinal dissocia-se do ribossomo e a síntese da proteína recomeça. Um complexo de translocação mantém o polipeptídeo crescente para dentro da luz do retículo endoplasmático, em uma reação que é direcionada pela energia do ATP (Rapoport, 1990). A seqüência sinalizadora é removida por uma peptidase sinal dentro da luz do retículo endoplasmático. Assim que a proteína completa é sintetizada, o ribossomo dissocia-se do retículo endoplasmático.

Na luz do retículo endoplasmático, as proteínas recém-sintetizadas são modificadas de várias maneiras. Além da remoção da seqüência sinalizadora, as cadeias polipeptídicas se enrolam e formam-se as pontes de dissulfeto. O endereçamento destas proteínas para os lisossomos é dependente de processos de glicosilação.



Após estes processos de glicolisação, as proteínas movem-se do retículo endoplasmático ao complexo de Golgi através de vesículas de transporte (Pfeffer et al, 1987). Um importante passo é a transferência de grupos fosfato para a posição da hidroxila do carbono 6 da manose terminal da porção oligossacarídica. Isto permite a ligação da enzima a receptores manose-6-fosfato presentes na membrana do complexo de Golgi e, finalmente, o seu direcionamento para o interior dos lisossomos (Lodish, 1988). O pH ácido dos lisossomos facilita a dissociação do complexo enzima-receptor (Gonzalez-Noriega et al., 1980; Tycko e Maxfield 1982). Nesta organela, outras modificações podem ocorrer para formar a enzima madura e funcionalmente ativa.

A formação de uma estrutura quaternária correta dentro do retículo endoplasmático constitui um evento importante que regula o transporte da proteína para o complexo de Golgi e finalmente, para o lisossomo (Lodish, 1988).

### 1.3 DOENÇAS LISSOSSÔMICAS

Distúrbios lisossômicos de depósito são classificados como erro inato do metabolismo causando deficiências genéticas que afetam enzimas lisossômicas. Segundo Meikle et al. (1997), 39 doenças lisossômicas (DLs) são reconhecidas, sendo que seis delas resultam de defeitos em proteínas de membrana. As demais ocorrem devido a alterações em proteínas do lúmen do lisossomo. A consequência deste distúrbio bioquímico se caracteriza pelo acúmulo intralisossômico de compostos não metabolizados, tais como mucopolissacarídeos, esfingolípídeos e glicoproteínas (Seashore e Wappner, 1996). Na figura 1 podemos observar o catabolismo de alguns esfingolípídios que se acumulam nas DLs.

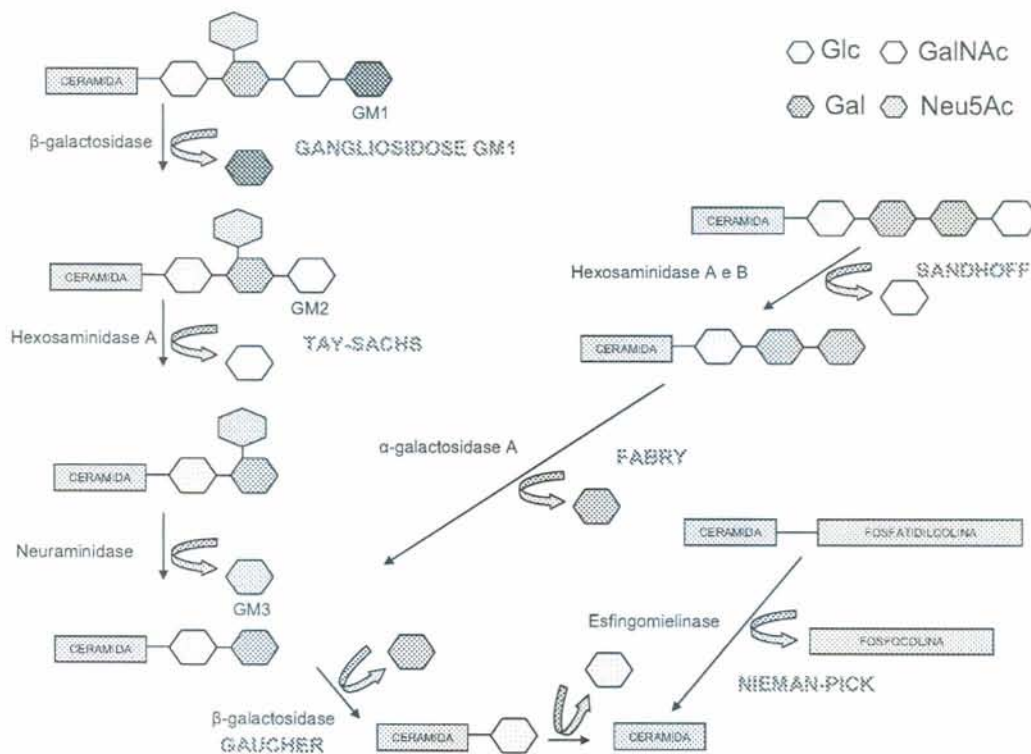
As enzimas destinadas ao lisossomo são sintetizadas no retículo endoplasmático (RE) e transportadas para o complexo de Golgi por meio de vesículas transportadoras. O direcionamento da síntese dessas enzimas ao RE é dado por um peptídeo sinalizador com cerca de 20 aminoácidos presentes na região amino-terminal da proteína nascente. Dentro do RE, a proteína precursora recém-sintetizada inicia modificações co-traducionais, incluindo a clivagem do peptídeo sinalizador e o processo de glicosilação. Subseqüentemente, as enzimas lisossômicas são, então, enviadas para o complexo de Golgi, onde seus oligossacarídeos covalentemente ligados são modificados enzimaticamente. Esse processo é realizado pela enzima glicosiltransferase, cuja função é adicionar resíduos de manose 6-fosfato à proteína. A adição desses resíduos é essencial para o endereçamento da proteína ao lisossomo. O complexo formado interage

com os receptores de manose 6-fosfato na membrana interna do Golgi e, assim, é separado da via secretória e dirigido para os lisossomos (Junqueira & Carneiro, 1997; Kornfeld e Mellman, 1989.) Após a liberação das vesículas lisossômicas para o interior da célula, os receptores dissociam-se das enzimas e podem ser reciclados. A completa interação entre os passos da síntese e direcionamento da enzima aos compartimentos intracelulares é essencial para a eficiência da atividade catalítica da mesma.

O surgimento de uma DL pode ser devido a uma série de fatores, tais como: (1) o precursor e a enzima podem não ser sintetizados ou sintetizados em uma taxa reduzida; (2) quantidades normais do precursor podem ser sintetizadas, mas ocorre degradação rápida da enzima; (3) o precursor pode não ter o marcador que reconhece o resíduo de manose 6-fosfato; (4) o precursor da forma madura da enzima pode ter suas propriedades fisicoquímicas e/ou enzimáticas alteradas; (5) a enzima pode ser degradada devido a ausência da proteína protetora requerida para sua estabilização; (6) a deficiência pode ser devido a ausência de um fator requerido para a atividade enzimática; (7) produtos que se acumulam como um resíduo da deficiência de uma enzima podem inibir a atividade de enzimas não relacionadas (Tager et al., 1984).

A maioria das DL possui herança autossômica recessiva, embora algumas apresentem herança ligada ao X (doença de Fabry e Mucopolissacaridose do Tipo II). O risco de recorrência na mesma irmandade é de 25%. A medida da atividade enzimática e a investigação do acúmulo de compostos não degradados nos tecidos, sangue e urina servem como parâmetro diagnóstico e se associam, em grande parte, com a severidade da patologia (Tager et al., 1984).

A análise molecular de enzimas lisossômicas é cada vez mais necessária, visto que a deficiência enzimática é gerada por mutações ou polimorfismos presentes na estrutura do gene. A associação do fenótipo ao genótipo torna-se com isso, cada vez mais necessária para a classificação da patologia (Neufeld, 1991).



**Figura 1** : Catabolismo de esfingolipídios em doenças lisossômicas. Adaptado de Nelson et. al., 1992.

O conhecimento de mutações gênicas tem auxiliado no diagnóstico pré-natal, no aconselhamento genético e na diferenciação de portadores com

pseudodeficiências que não são distinguidos pelos métodos tradicionais de diagnóstico (DeMarchi et. al., 1996).

A deficiência hereditária da enzima lisossômica  $\beta$ -galactosidase ( $\beta$ -gal) é expressa clinicamente em três diferentes doenças: Gangliosidose GM1, Doença de Morquio B (MPS IV/B) e Galactosialidose. Esta última, ao contrário das outras, é caracterizada por uma deficiência secundária de  $\beta$ -gal por falta de uma proteína protetora que confere estabilidade à enzima madura. Enquanto a Gangliosidose GM1 é uma doença neurodegenerativa com envolvimento visceral, a doença de Morquio tipo B se expressa por uma displasia esquelética sem comprometimento do SNC. Esta heterogenidade clínica deve-se a diferentes mutações neste gene determinando uma atividade residual diferente da enzima mutante para diferentes substratos (Suzuki et al., 1995).

## 1.4 GANGLIOSIDOSE GM1

A Gangliosidose GM1 foi descrita primeiramente por O'Brien et al. (1965) e inicialmente denominada como *Generalized Gangliosidosis*. Okada e O'Brien (1968), demonstraram pela primeira vez que a gangliosidose generalizada era causada por uma deficiência enzimática. A partir de então começaram os diagnósticos bioquímicos baseados na medida da atividade da enzima  $\beta$ -gal ácida em leucócitos e em fibroblastos (Tager et al., 1984).

Inicialmente, a Gangliosidose GM1 era conhecida como uma doença infantil, mas este conceito se expandiu em 1974, quando foram incluídas as formas juvenil e adulta da patologia, com sintomas mais brandos e maior expectativa de vida (Derry et al., 1968; Loonen et al., 1974). Em todos os casos o substrato, Gangliosídeo GM1, se acumula progressivamente nos lisossomos (Jeyakumar et al., 2003).

Giugliani e colaboradores em 1985, descreveram que a Gangliosidose GM1 era o erro inato do metabolismo com maior frequência de diagnósticos no sul do Brasil (Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre).

### 1.4.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

A incidência da Gangliosidose GM1 varia, segundo os autores, entre 1:100.000 (Vainer & Rousson, 1984; Whitley, 1993) e 1:200.000 nascimentos (Beattle & Harvey, 1992) na Europa e nos Estados Unidos. No sul do Brasil, existe uma alta frequência da doença: 1:17.000 nascimentos com incidência de

heterozigotos de 1 para cada 67 indivíduos sendo que a taxa de consangüinidade entre os pais dos afetados foi de 12,5% (Severini et al., 1999).

A apresentação clínica permite uma identificação inicial, e exames complementares como o exame do fundo de olho, ressonância magnética nuclear ou exames neurofisiológicos, permitem o direcionamento para a solicitação de exames mais específicos e definitivos, tais como a medida da atividade enzimática específica e o estudo molecular na família portadora (Colombo et al., 2003).

Por ser uma doença herdada de forma autossômica recessiva, com heterozigotos não afetados, na Gangliosidose GM1 50% da atividade enzimática residual é suficiente para garantir o fenótipo normal (Jeyakumar et al., 2003)

Os diferentes fenótipos da gangliosidose GM1, com relação à idade de manifestação e severidade do quadro clínico, levaram a subdivisão em três diferentes tipos: (1) Gangliosidose GM1 Tipo 1 ou forma infantil, (2) Gangliosidose GM1 Tipo 2 ou forma Juvenil e (3) Gangliosidose GM1 Tipo 3 ou forma adulta (O'Brien et al., 1972)

#### **1.4.2 GANGLIOSIDOSE GM1 TIPO 1 OU FORMA INFANTIL**

A forma mais grave da gangliosidose GM1 é o tipo 1 ou forma infantil. Clinicamente, o paciente tem feições faciais grosseiras, com espessamentos dos lábios, depressão da ponte nasal, orelhas grandes e de baixa implantação e hipertrofia gengival. Nesta forma da doença usualmente já se verifica retardo no desenvolvimento neurológico e psicomotor (O'Brien, 1983; O'Brien, 1989; Suzuki et al., 1995). Comumente, nos primeiros 6 meses o paciente desenvolve um

quadro de esplenomegalia, muitas vezes associado a hepatomegalia (O'Brien, 1983).

Devido ao acúmulo secundário de queratan sulfato, os pacientes apresentam deformidades ósseas (Factor et al., 1978).

Após o primeiro ano de vida começam as complicações mais severas, como convulsões tônico-clônicas, respiração difícil e irregular. Em torno de 16 meses o paciente já se encontra em um quadro de paralisia cerebral, apresentando cegueira e surdez, quadriplegia espástica e falta de resposta a estímulos externos. Alterações cardíacas como coração dilatado, cardiomiopatia e ventrículos hipertróficos foram descritos por Rosemberg e colaboradores (1985), Severini (1997). A morte costuma ocorrer nos primeiros anos de vida (Suzuki et al., 1995).

#### **1.4.3 GANGLIOSIDOSE GM1 TIPO 2 OU FORMA JUVENIL**

A idade de início do quadro clínico é bastante variável. Durante o primeiro ano de vida o desenvolvimento psicomotor é normal, entretanto, logo após o primeiro ano de vida, surge ataxia locomotora como primeiro sintoma. A deterioração mental e motora progride rapidamente, ocorre perda de socialização e letargia.

Assim como na forma infantil, as infecções pulmonares recorrentes são geralmente a causa de morte. A média de vida é de 3 a 10 anos de idade (O'Brien, 1983; O'Brien, 1989; Suzuki et al., 1995).



#### 1.4.4 GANGLIOSIDOSE GM1 TIPO 3 OU FORMA ADULTA

Pacientes com Gangliosidose GM1 tipo 3 são diagnosticados geralmente entre os 15 e 22 anos de idade. Os primeiros sintomas demonstrados são disartria cerebelar progressiva, levando a espasticidade e ataxia. A progressão dos sintomas é lenta, mas a perda de função intelectual é evidente. Distonia é a manifestação neurológica mais visível e aumenta gradualmente. A atividade da enzima  $\beta$ -galactosidase é baixa, cerca de 10% da observada em controles normais (Suzuki et al., 1995).

Na tabela 1, podemos comparar os principais sinais e sintomas das três formas clínicas da Gangliosidose GM1.

**Tabela 1:** Resumo das características clínicas da Gangliosidose GM1 modificado de Suzuki e colaboradores, 1995.

<b>Sinais e Sintomas</b>	<b>Infantil (Tipo 1)</b>	<b>Infantil Tardia/ Juvenil (Tipo 2)</b>	<b>Adulta (Tipo 3)</b>
Início	0-6 meses	7 meses - 3 anos	3-30 anos
Duração	< 2 anos	1- anos	10-30 anos
Comprometimento do SNC	Generalizada	Generalizada	Localizada
Deficiência Mental	+++	++	+ ou -
Comprometimento do SNP	-	-	-
Alterações Musculares	-	-	+ ou -
Mancha vermelho-cereja	+	+ ou -	-
Hepatoesplenomegalia	+	+ ou -	-
Dismorfismo	+ ou -	+ ou -	-
Alterações ósseas	Generalizada	Generalizada	Localizada
Depósito de Gangliosídeo GM1	+++	++	+
Excreção de Oligossacarídeos	+++	++	+
Excreção de Queratan Sulfato	+	+	ND

+++ = grave ++ = moderado + = brando - = ausente ND = não determinado

#### 1.4.5 ASPECTOS BIOQUÍMICOS DA GANGLIOSIDOSE GM1

A  $\beta$ -galactosidase ácida é uma hidrolase lisossômica heterocatalítica que tem a capacidade de clivar resíduos galactosil terminais de vários glicoconjugados: glicolipídeos, oligossacarídeos, queratan sulfato e especialmente do Gangliosídeo GM1 (O'Brien et al., 1972). Esta enzima é uma glicoproteína sintetizada em uma forma precursora com peso molecular de 88 KDa que, após processamento, dá origem a uma enzima madura com 64 KDa, contendo de 7,5 a 9% de carboidratos em sua estrutura (Frost et al., 1978). A forma madura da enzima se dá pela perda de uma porção C-terminal da proteína, o que equivale à cerca de 12KDa (Okamura-Oho et al., 1996). O pH ótimo de funcionamento da enzima é de 4,2, sendo lábil ao calor e ativada por íons cloreto (Ho & O'Brien, 1971).

Grande parte da enzima  $\beta$ -galactosidase é isolada sob a forma de multímero, complexada com as enzimas neuraminidase e a proteína protetora (Hoeksema et al., 1979; Norden et al., 1974; Hoogeveen et al., 1983; Yamamoto et al., 1982). Pshezhetsky e colaboradores (1992) apontam algumas evidências indicando que a multimerização resulta em uma maior atividade da enzima  $\beta$ -galactosidase, entretanto, outros relatos discordam desta idéia (Sheibe et al., 1990). A associação da enzima  $\beta$ -galactosidase com a neuraminidase, as protege de uma rápida degradação dentro do lisossomo (D'Azzo et al., 1982). Já a associação da proteína protetora com a  $\beta$ -galactosidase auxilia o percurso desta em direção aos lisossomos (Morreau et al., 1992).

Alguns estudos mostram que as três enzimas que formam o complexo multienzimático são codificadas por três genes diferentes (Hoeksema et al., 1979; Hoogeveen et al., 1980).

A ação das enzimas lisossômicas, devido a sua especificidade, é calcada na associação com “ativadores” protéicos. Para a  $\beta$ -galactosidase, o ativador denomina-se saposina (SAP-1) que atua como um detergente natural facilitando a interação da enzima com os substratos do tipo gangliosídeo, insolúveis em água (Li & Li, 1976; Wenger & Inui, 1984; O'Brien et al., 1988). Sabe-se que na doença de Morquio B a SAP-1 ativa a enzima  $\beta$ -galactosidase, fazendo com que esta hidrolise o gangliosídeo GM1, mas não o queratan sulfato, que é o substrato preferencialmente acumulado na doença de Mórquio tipo B.

O gangliosídeo GM1 é o principal sialogangliosídeo de membrana neuronal que, entre outras funções, modula a homeostasia do cálcio (Tessitore et al., 2004). Este monosialogangliosídeo constitui 20% dos gangliosídeos do cérebro normal, elevando-se para 80% a 90% na gangliosidose GM1 (Colombo et al., 2003).

#### 1.4.6 ASPECTOS MOLECULARES

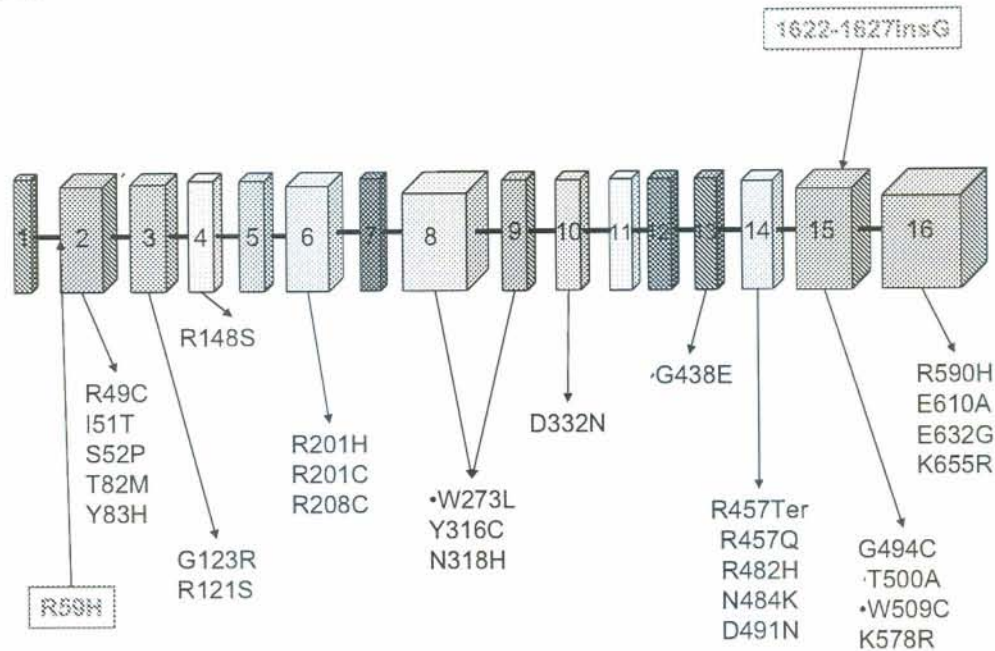
O gene da enzima  $\beta$ -galactosidase está localizado no braço curto do cromossomo 3 (Sips, 1985), apresentando 16 exons distribuídos em 62,5 Kb. Os exons apresentam tamanhos que variam de 41 pb a 300 pb.

Três grupos de pesquisadores, de forma independente, clonaram, caracterizaram e expressaram a seqüência de cDNA da enzima humana (Oshima et al., 1988; Morreau et al., 1989, Yamamoto et al., 1990). A seqüência contém uma região codificante de 2031 pb que dá origem a uma proteína de 677 aminoácidos. Além disso, apresenta uma seqüência sinalizadora (peptídio sinal) de 23 aminoácidos e 7 sítios potenciais de glicosilação por molécula.

A seqüência promotora do gene da  $\beta$ -galactosidase apresenta característica do tipo housekeeping, com regiões ricas em CG. Nesta região foi encontrada a seqüência convencional de promotores (TATA Box)(Morreau et al., 1991).

Aproximadamente 50 mutações no gene da  $\beta$ -galactosidase estão descritas na literatura (<http://uwcmm11s.ac.uk/uwcm/mg/search/119987.html>), três são mutações de sítio de splicing, duas são duplicações, três são inserções que levam a alteração no quadro de leitura e duas determinam o término prematuro da cadeia. As demais mutações descritas ao longo deste gene são do tipo sentido trocado (missense). A caracterização do gene mostra que 77,5% das mutações identificadas estão localizadas nos exons 2, 3, 6, 8, 14, 15 e 16 (figura 2).

As mutações de substituição de nucleotídeos são as mais descritas (Tabela 2) (Nishimoto et al., 1991; Yoshida et al., 1991; Oshima et al., 1991; Silva et al., 1999).



**Figura 2:** Mutações no gene da β-galactosidase (Callahan, 1999)

Algumas mutações são consideradas de maior relevância no Brasil pois perfazem 60% do genótipo de indivíduos analisados no Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre: a mutação R59H (Morrone et al., 1997) e a 1622-1627 insG. (Silva et al., 1999). Uma análise populacional com a identificação destas duas mutações em 390 doadores de sangue do Banco de sangue do HCPA confirmou a frequência estimada de portadores na população em 1:67, valor semelhante ao encontrado em nosso meio para Fenilcetonúria (Baiotto, 2001).

Tabela 2: Mutações de ponto no Gene da  $\beta$ -galactosidase ácida Humana

Mutação	Alteração no Códon	Mudança do Aminoácido	Número do Códon	Fenótipo	Referência
R121H	AGGc-AGT	Arg-Ser	121	Gangliosidose GM1	<a href="#">Silva (1999)</a>
Q123R	cGGG-AGG	Gly-Arg	123	Gangliosidose GM1 -infantil	<a href="#">Yoshida (1991)</a>
R148S	cCGC-AGC	Arg-Ser	148	Gangliosidose GM1	<a href="#">Morrone (2000)</a>
D151Y	cGAC-TAC	Asp-Tyr	151	Gangliosidose GM1	<a href="#">Georgiou (2004)</a>
R201H	CGC-CAC	Arg-His	201	Gangliosidose GM1 - adulta	<a href="#">Kaye (1997)</a>
R201C	gCGC-TGC	Arg-Cys	201	Gangliosidose GM1 - juvenil	<a href="#">Yoshida (1991)</a>
R208C	tCGC-TGC	Arg-Cys	208	Gangliosidose GM1 - infantil	<a href="#">Boustany (1993)</a>
D214Y	tGAT-TAT	Asp-Tyr	214	Gangliosidose GM1	<a href="#">Morrone (2000)</a>
V216A	GTT-GCT	Val-Ala	216	Gangliosidose GM1	<a href="#">Morrone (2000)</a>
V240M	gGTG-ATG	Val-Met	240	Gangliosidose GM1	<a href="#">Silva (1999)</a>
P263S	aCCC-TCC	Pro-Ser	263	Gangliosidose GM1 - adulta	<a href="#">Morrone (2000)</a>
N266S	AAT-AGT	Asn-Ser	266	Gangliosidose GM1 - adulta	<a href="#">Kaye (1997)</a>
Y270D	cTAT-GAT	Tyr-Asp	270	Morquio B	<a href="#">Paschke (2001)</a>
W273L	TGG-TTG	Trp-Leu	273	Morquio B	<a href="#">Oshima (1991)</a>
H281Y	tCAC-TAC	His-Tyr	281	Neuronal affection	<a href="#">Paschke (2001)</a>
Y316C	TAT-TGT	Tyr-Cys	316	Gangliosidose GM1 - infantil	<a href="#">Yoshida (1991)</a>
D332N	cGAC-AAC	Asp-Asn	332	Gangliosidose GM1	<a href="#">Zhang (2000)</a>
R351X	gCGA-TGA	Arg-Term	351	Gangliosidose GM1	<a href="#">Hinek (2000)</a>
G408P	CAG-CCG	Gln-Pro	408	Morquio B	<a href="#">Paschke (2001)</a>
G438Q	GGA-GAA	Gly-Glu	438	Morquio B	<a href="#">Hinek (2000)</a>
R457Q	CGA-CAA	Arg-Gln	457	Gangliosidose GM1 - adulta	<a href="#">Yoshida (1991)</a>
R457X	gCGA-TGA	Arg-Term	457	Gangliosidose GM1 - infantil	<a href="#">Nishimoto (1991)</a>
R482C	aCGT-TGT	Arg-Cys	482	Morquio B	<a href="#">Ishii (1995)</a>
R482H	CGT-CAT	Arg-His	482	Morquio B e GM1 infantil	<a href="#">Oshima (1991)</a>
R49C	tCGC-TGC	Arg-Cys	49	Gangliosidose GM1 - infantil	<a href="#">Nishimoto (1991)</a>
D491N	cGAT-AAT	Asp-Asn	491	Gangliosidose GM1	<a href="#">Silva (1999)</a>
G494C	gGGT-TGT	Gly-Cys	494	Gangliosidose GM1 - infantil	<a href="#">Oshima (1991)</a>
T500A	gACT-GCT	Thr-Ala	500	Morquio B	<a href="#">Hinek (2000)</a>
W509C	TGGa-TGT	Trp-Cys	509	Morquio B	<a href="#">Oshima (1991)</a>
I51T	ATC-ACC	Ile-Thr	51	Gangliosidose GM1-Adulta	<a href="#">Yoshida (1991)</a>
Y57X	TACt-TAG	Tyr-Term	57	Gangliosidose GM1	<a href="#">Georgiou (2004)</a>
K578R	AAG-AGG	Lys-Arg	578	Gangliosidose GM1	<a href="#">Boustany (1993)</a>
G579D	GGC-GAC	Gly-Asp	579	Gangliosidose GM1	<a href="#">Morrone (2000)</a>
R59H	CGT-CAT	Arg-His	59	Gangliosidose GM1 - infantil	<a href="#">Silva (1999)</a>
R590H	CGC-CAC	Arg-His	590	Gangliosidose GM1 - juvenil	<a href="#">Boustany (1993)</a>
Y591N	cTAT-AAT	Tyr-Asn	591	Gangliosidose GM1 - infantil	<a href="#">Morrone (2000)</a>
Y591C	TAT-TGT	Tyr-Cys	591	Gangliosidose GM1 - infantil	<a href="#">Morrone (2000)</a>
E632G	GAA-GGA	Glu-Gly	632	Gangliosidose GM1 - juvenil	<a href="#">Boustany (1993)</a>
R68W	cCGG-TGG	Arg-Trp	68	Gangliosidose GM1	<a href="#">Caciotti (2003)</a>
T82M	ACG-ATG	Thr-Met	82	Gangliosidose GM1 - adulta	<a href="#">Chakraborty (1994)</a>
Y83H	gTAT-CAT	Tyr-His	83	Morquio B	<a href="#">Ishii (1995)</a>

#### 1.4.7 DIAGNÓSTICO

O diagnóstico da Gangliosidose GM1 inicia-se com uma detalhada avaliação clínica, a partir do momento em que o paciente começa a apresentar manifestações neurológicas, como retardo no desenvolvimento neuromotor. Subseqüentemente, deve-se avaliar os seguintes exames laboratoriais: cromatografia de oligossacarídeos, sialoligossacarídeos e mucopolissacarídeos na urina e ensaio enzimático para a enzima  $\beta$ -galactosidase em leucócitos ou fibroblastos (Callaha, 1999).

Exames laboratoriais complementares podem ser realizados em associação, tais como: avaliação da presença de linfócitos vacuolados no sangue, níveis de gangliosídeo GM1 mais elevados no liquor em relação aos controles, eletrocardiografia/ecocardiografia e eletroencefalografia (Severi et al., 1971; Suzuki et al., 1995)

O diagnóstico pré-natal pode ser realizado através da medida da atividade enzimática em amniócitos cultivados ou em vilosidades coriônicas. Indivíduos heterozigotos podem ser detectados por apresentar cerca de 50% da atividade enzimática normal em fibroblastos (Singer et al., 1972; Sopelsa et al., 2000).



#### 1.4.8 TRATAMENTO

A terapia de reposição enzimática tem se mostrado eficiente para o tratamento de pacientes com Mucopolissacaridose, Doença de Gaucher, Doença de Fabry e está em processo de desenvolvimento para outras DLs. Entretanto, para a Gangliosidose GM1, a necessidade de uma grande quantidade de enzima e com alto grau de pureza tem dificultado a realização desta prática. Além disso, a dificuldade da molécula de atravessar a barreira hematoencefálica diminui ainda mais as chances de êxito da terapia (Colombo et al., 2003; Cheng e Smith, 2003).

Alguns resultados satisfatórios tem sido relatados com transplantes de medula óssea em pacientes com Mucopolissacaridoses do tipo I, II e VI e em pacientes com doença de Gaucher Tipo I (Salveti e Danos, 1995). O Transplante de medula já foi realizado em modelos animais para Gangliosidose GM1, porém com resultados insatisfatórios (O'Brien et al., 1989).

Estudos experimentais de transferência gênica utilizando vetores retrovirais foram capazes de promover *in vitro* (fibroblastos de pacientes com Gangliosidose GM1) e *in vivo* (cérebro de camundongos knockout) a correção da deficiência da  $\beta$ -gal (Sena-Esteves et al., 2000).

Em 2003, Matsuda e colaboradores sintetizaram uma chaperona química para o tratamento da Gangliosidose GM1, molécula esta que está envolvida na proteção da enzima mutante até a sua entrada no lisossomo, tornando-a estável e funcional.

Entretanto, até o presente momento, não há um tratamento efetivo para a gangliosidose GM1, nem para as outras DLs com envolvimento no SNC. As

medidas terapêuticas oferecidas a esses pacientes não tem sido capazes de assegurar a qualidade de vida, nem de prolongar o tempo de sobrevivência.

## 2 OBJETIVOS

O presente trabalho faz parte de um estudo multidisciplinar e foi baseado nos seguintes objetivos:

- A. Padronizar a técnica de SSCP para a triagem de mutações em pacientes com gangliosidose GM1;
- B. Realizar a triagem de mutações empregando o método de SSCP (Polimorfismo Conformacional de Fita Simples de DNA) e avaliar o mesmo como metodologia;
- C. Caracterizar, em nível molecular, as alterações presentes no gene da  $\beta$ -galactosidase ácida de pacientes com Gangliosidose GM1, visando contribuir para a o diagnóstico molecular.

### 3 MATERIAL E MÉTODO

#### 3.1 PACIENTES

Foram utilizados para este estudo, 20 pacientes com Gangliosidose GM1, diagnosticados no Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. O diagnóstico foi baseado na anamnese clínica e medica da atividade residual da enzima  $\beta$ -galactosidase em leucócitos e/ou fibroblastos.

#### 3.2 PREPARAÇÃO DO DNA E AMPLIFICAÇÃO – REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

O DNA foi extraído de 5-10 mL de sangue periférico utilizando para isso o método descrito por Miller e colaboradores (1988). A amplificação foi realizada de acordo com a reação em cadeia da polimerase: 100ng DNA genômico /100 pmol por cada primer, 1,25 mM dNTP, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM Tris-HCl pH 8,3, 50 mM KCl, 2,5U Taq DNA Polimerase. Os primers utilizados estão listados na tabela 3. A amplificação dos fragmentos foi realizada primeiramente com 5 minutos, 94°C para desnaturação, seguido de 39 ciclos: desnaturação = 30 seg a 94°C; anelamento = 45 seg ; extensão = 72°C por 30 seg. Este processo foi seguido de uma extensão final de 10 min a 72°C.

**Tabela 3:** Oligonucleotídeos (primers) utilizados nas Reações de PCR (Baiotto et al., 2001)

EXON	SENSE 5' → 3'	ANTISENSE 3' → 5'	TAMANHO PCR (bp)
1	TCATGCCGGGGTTCCTGGTTCGC	GGGTCCCGCAGACTTACGCGC	94
2	GAATTC AAGGTGGAAGTTCTCATGTG	CAATTCTGTT CAGGCCTAGGTGAGA	261
3	CTGCCAAGTATCCAGGAAGGGG	CACACACCAGGTAGAGCCCAGTC	227
4	TAATGGCTTGTTTTCCCTGA	TTCTCAAGACATCTGTAACAACCTA	111
5	AGCTTGTGTTAAACTTTTCTTGT	GAATCCATGCTCAACTCCAG	153
6	TTCCTGCTCTTTTTTCACTCACAG	CTGCAATTTCTGTTACTACAAACACC	235
7	CCTTCTCCCTCTTACAATTTTCAGG	CACACCTCACCTCGATTCTTAC	107
8 e 9	ATAAGTCTATCCTAAGGGCTACGTTT	ATTAAGTGCTCTTACCATTCCAAT	303
10	CACCATCAGTAATAACTAGTGGCAC	CACCCACCACAGCTCATACA	185
11	TTCTCTTTTTTCTACTCTGGTTT	AAAGTTTCTGTTATTTTTTTTTCTTA	130
12	GTGTGTGAATGCTGCTTTTGTGTT	GAAAAAAGGCGAGGCATTACC	155
13	TTTTTCTTAAATCCTTTTCTAACCA	ACGCACAGTTCAGAGACGATT	166
14	TGTCATTTTGGTCTTGAACCCC	TTAAACCTTAGTCTTGACAGTGTGGT	192
15	GAATTCCCTCCCCAGCTCACTGTG	GAATTCAAACCCTTCCCATGAAGAC	328
16	CATCTGGGGTTGATGGTTCTCTG	CTCAAAGACACAGGCTTTCATCA	367

Para o presente trabalho foram amplificados os exons (2, 3, 6, 7, 8/9, 10, 12, 14, 15 e 16) sob temperatura de anelamento de 65°C e os exons (1, 4, 5, 11 e 13) sob a temperatura de anelamento de 58° C. A verificação dos produtos da PCR foi realizada através de eletroforese em gel de agarose 1,5% com brometo de etídio e visualizada em transiluminador com luz ultravioleta (UV) (Baiotto et al 2001).

### 3.3 POLIMORFISMO CONFORMACIONAL DE FITA SIMPLES (SSCP)

A análise em SSCP foi realizada com a finalidade de identificar fragmentos de DNA contendo substituições de bases. Aliquotas de 8 µl do produto da PCR foram misturados com 4 µl de corante (95% formamida, 10 mM NaOH, 0,25% azul de bromophenol, 0,25% xylene cyanol) e submetidos a uma desnaturação a 94°C

por 5 min em termociclador. Depois de desnaturadas as amostras foram colocadas imediatamente a 0°C. Três condições de migração foram testadas: (1) Migração em gel 10 x 10 cm de poliacrilamida 8% com TBE 1x sob a voltagem de 50V, 300mA durante uma hora e trinta minutos; (2) Migração em gel 10 x 10 cm de poliacrilamida 12% com TBE 1x sob a voltagem de 50V, 300mA durante duas horas e vinte minutos; (3) Migração em gel 10 x 10 cm de poliacrilamida 12% com TBE 1x sob a voltagem de 50V, 300mA durante uma hora. Depois da eletroforese os produtos foram detectados no gel usando o método de coloração com prata descrito por Orita e colaboradores (1989).

### 3.4 SEQUENCIAMENTO AUTOMATIZADO

O produto do PCR dos exons 2 e 15 foi seqüenciado no seqüenciador automático (ABI-PRISM 310) utilizando os mesmos primers para a reação de PCR convencional. A amplificação para seqüenciamento automatizado foi realizada com o *BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit* (Perkin Elmer Applied Biosystems, Foster City, CA). Para esta reação foi utilizado 35 ng do produto de PCR purificado, 1,0 µmol de iniciador sense ou anti-sense, 1,0 µl da solução *Terminator Ready Reaction Mix* do *BigDye* e água destilada estéril (volume final 10 µl). A reação, distribuída em placa própria para sequenciamento, foi protegida da luz com papel de alumínio. Em termociclador automático as amostras foram submetidas a uma desnaturação inicial a 96°C por 2 minutos e 30 ciclos, com as seguintes temperaturas e tempos: desnaturação a 96°C por 10

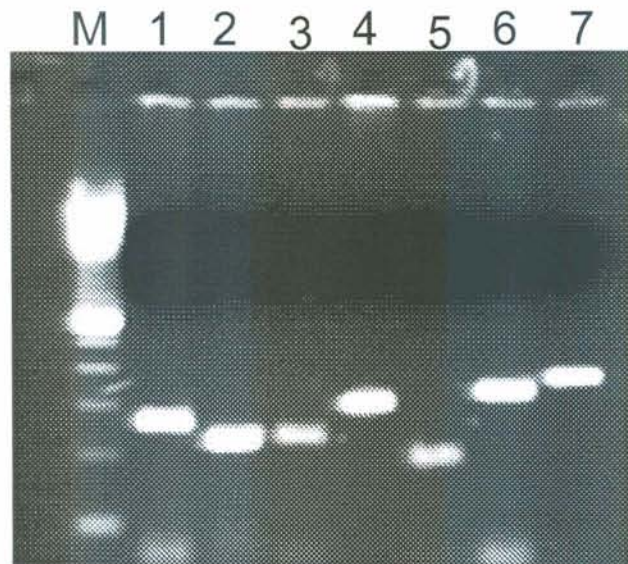
segundos, anelamento a 57 °C por 5 segundos e extensão a 60 °C por 4 minutos. O produto desta nova reação de PCR foi submetido à purificação: 2µl de acetato de amônio 7,5M e 50µl de etanol absoluto foram adicionados aos 10 µl da reação, com posterior homogeneização. Após incubação por 15 minutos em temperatura ambiente protegido da luz, o tubo foi centrifugado a 13.000 rpm, em temperatura ambiente por 30 minutos. O sobrenadante foi removido com o uso de pipeta de 200 µl e a seguir foi adicionado 100µl de etanol 70%. Posteriormente o material foi centrifugado a 13.000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi desprezado com a pipeta de 200 µl com cuidado para não remover o precipitado. Para completa remoção do etanol, a placa foi aquecida em termobloco a 65°C de 30 a 40 minutos para a secagem do tubo. O produto da purificação foi armazenado a -20°C, protegido da luz com papel alumínio até a eletroforese.

Para a eletroforese, adicionou-se 10ul de *loading buffer*, uma solução de formamida (Invitrogen). As amostras foram homogeneizadas, desnaturadas a 95°C por 5 minutos e colocadas em gelo e, a seguir, foram aplicadas no seqüenciador automático (*ABI Prism 310 DNA Sequencer*). A análise dos cromatogramas foi feita de forma visual, comparando-se a seqüência gerada pelo fragmento derivado da reação de sequenciamento com a seqüência descrita na literatura. Este procedimento possibilitou a identificação de 5 mutações ainda não descritas na literatura.

#### 4. RESULTADOS

O DNA genômico (DNA) de 20 pacientes foi extraído amplificado usando primers específicos para cada um dos exons estudados do gene da  $\beta$ -galactosidase. A figura 3 mostra um gel de agarose com o produto de PCR de alguns dos diferentes exons amplificados.

Figura 3

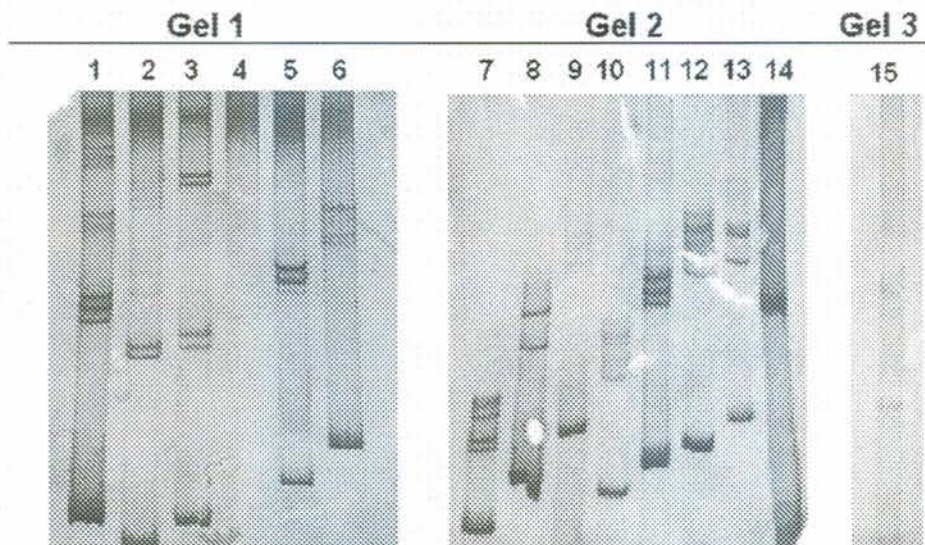


**Figura 3:** Análise do produto da PCR em gel de agarose 1,5%. **Canaleta M:** Marcador de peso molecular. **Canaleta 1:** PCR exon 2. **Canaleta 2:** PCR exon 3. **Canaleta 3:** PCR exon 6. **Canaleta 4:** PCR exon 8/9. **Canaleta 5:** PCR exon 14. **Canaleta 6:** PCR exon 15. **Canaleta 7:** PCR exon 16.

Depois de amplificado, o produto de PCR serviu de amostra para a realização do método de SSCP que ficou padronizado da seguinte maneira: Três condições de migração foram estabelecidas: (1) exons 1, 2, 3, 6, 8/9 e 16



migraram em gel 10 x 10 cm de poliacrilamida 8% com TBE 1x sob a voltagem de 50V, 300mA durante uma hora e trinta minutos; (2) exons 4, 5, 10, 11, 12, 13, 14 e 15 migraram em gel 10 x 10 cm de poliacrilamida 12% com TBE 1x sob a voltagem de 50V, 300mA durante duas horas e vinte minutos; (3) exon 7 migrou em gel 10 x 10 cm de poliacrilamida 12% com TBE 1x sob a voltagem de 50V, 300mA durante uma hora. A figura 4 mostra os dados de padronização do SSCP para os diferentes exons.



**Figura 4: Padronização de SSCP: Gel 1:** gel 10 x 10 cm de poliacrilamida 8% (1h e 30 min); **Gel 2:** gel 10 x 10 cm de poliacrilamida 12% (2h e 20 min); **Gel 3:** gel 10 x 10 cm de poliacrilamida 12% (1 hora). Em todas as condições a migração foi realizada com TBE 1x sob a voltagem de 50V, 300mA. **Canaleta 1:** Exon 2; **Canaleta 2:** Exon 3; **Canaleta 3:** Exon 6; **Canaleta 4:** Exon 1; **Canaleta 5:** Exon8/9; **Canaleta 6:** Exon 16; **Canaleta 7:** Exon 4; **Canaleta 8:** Exon 5; **Canaleta 9:** Exon 10; **Canaleta 10:** Exon 11; **Canaleta 11:** Exon 12; **Canaleta 12:** Exon 13; **Canaleta 13:** Exon 14; **Canaleta 14:** Exon 15; **Canaleta 15:** Exon 7

Este estudo, que tem como objetivo realizar uma triagem de novas mutações, analisou o perfil de mobilidade da fita simples de DNA (SSCP) à partir do produto da PCR previamente amplificado e verificado em gel de agarose 1,5%. As amostras que apresentaram perfil de migração de DNA fita simples alterado em relação ao controle normal foram consideradas passíveis de conter mutações e foram seqüenciadas em seqüenciador automático ABI 310.

Após realizar a padronização do método de SSCP (Polimorfismo Conformacional de Fita Simples de DNA) as amostras foram agrupadas por exon e submetidas a análise do perfil de migração de DNA fita simples em gel de Poliacrilamida. Quatro pacientes apresentaram mais de quatro exons alterados, quatro pacientes apresentaram dois exons alterados, cinco pacientes apresentaram três exons alterados, cinco pacientes apresentaram somente um exon alterado e dois pacientes não apresentaram nenhum exon contendo alteração de mobilidade de DNA fita simples. A tabela 4 resume o número de alterações encontradas por paciente.

**Tabela 4:** Análise das alterações de migração da fita simples de DNA em gel de Poliacrilamida nos diferentes exons por paciente

Paciente	Exons Alterados
1	2,4,10,12,14,15,16
2	2,15
3	2,10,15
4	0
5	2,3,6,8e9,14,15
6	2,6,10,11,12,14
7	4,15
8	7
9	2,15
10	2,5,15
11	15
12	4
13	2,4,15
14	15
15	2,4,10
16	5,14,15
17	6,7,10,14
18	4,15
19	0
20	2

Conforme a tabela 5, sob as condições de SSCP utilizadas, não foram identificadas alterações de migração de fita simples de DNA no exon 1, entretanto foram encontradas 9 padrões de migração no exon 2, 1 alteração no exon 3, 6 alterações no exon 4, 2 alterações no exon 5, 3 padrão alterado no exon 6, 2 padrões alterados no exon 7, 2 alterações no exon 8/9, 3 alterações no exon 10, 3 alterações no exon 11, 2 alterações no exon 12, nenhuma alteração no exon 13, 6 alterações no exon 14, 12 alterações no exon 15 e 2 alterações no exon 16, totalizando 53 alterações de perfil de mobilidade da fita simples de DNA em gel de

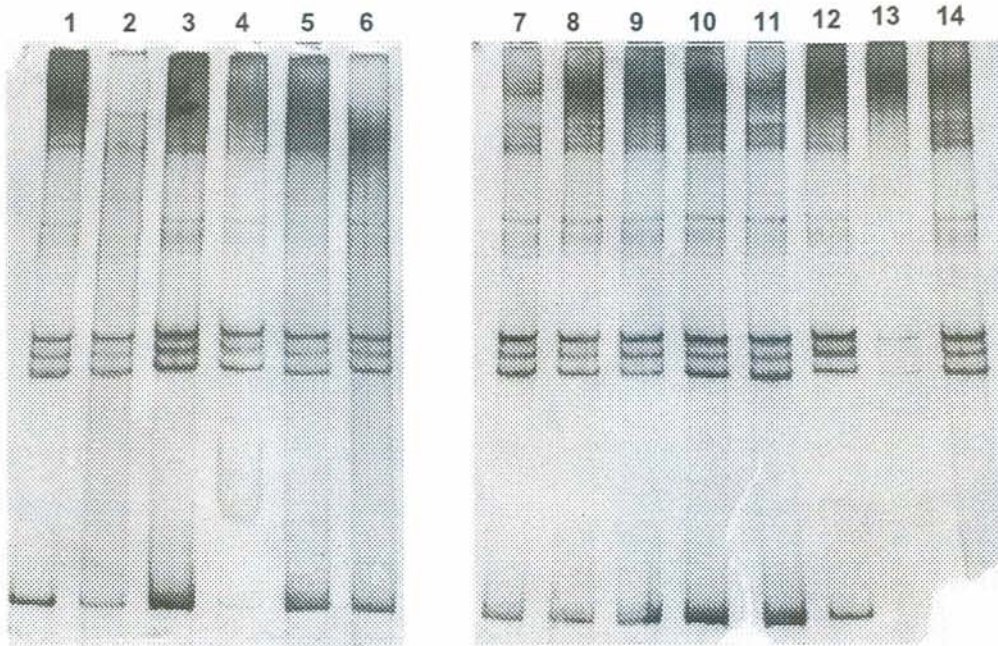
poliacrilamida, que serve como um forte indicativo de alteração molecular nestes genomas.

**Tabela 5:** Alterações de migração da fita simples de DNA – SSCP em cada exon na população estudada.

EXON	NÚMERO DE ALTERAÇÕES
1	0
2	9
3	1
4	6
5	2
6	3
7	2
8	2
10	3
11	3
12	2
13	0
14	6
15	12
16	2
<b>TOTAL</b>	<b>53</b>

No exon 2, onde se encontra uma das duas mutações mais freqüentes no Sul do Brasil – R59H (Silva et al., 1999), as amostras relativas aos pacientes 2, 3 e 13 apresentaram um perfil de migração no SSCP muito semelhante ao padrão heterozigoto para a mutação R59H. Já o paciente 6 apresentou uma migração bastante semelhante ao controle homozigoto para essa mutação. Estas comparações sugerem um provável genótipo para este paciente (figura 5).

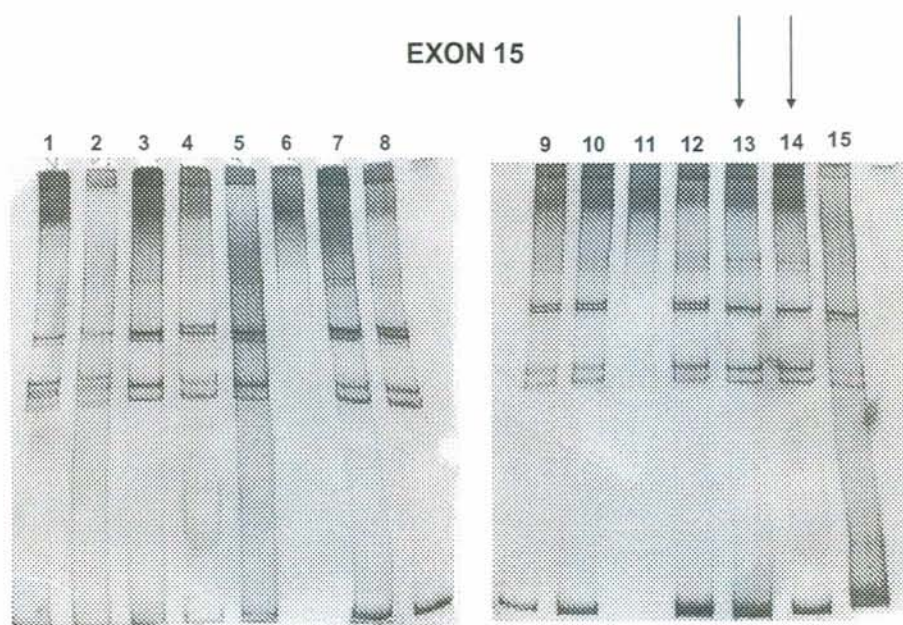
## EXON 2



**Figura 5: SSCP do EXON 2: Canaletas 2:** controle heterozigoto R59H. **Canaleta 1 e 11:** migração semelhante a canaleta 2. **Canaletas 5:** Controle Homozigoto R59H. **Canaleta 6:** migração semelhante a canaleta 5. **Canaletas 3,7,8,9,10,12,13,14 :** Sem alterações de migração neste exon. **Canaleta 4:** mobilidade alterada.

Na figura 6, podemos observar o gel de poliacrilamida relativo ao exon 15, onde se encontra a outra mutação mais freqüente no sul do Brasil – 1622-1627insG (Silva et al., 1999). Nesta figura notamos que o perfil de migração do DNA fita simples na canaleta 9 (paciente 2) é muito semelhante ao perfil de migração do controle heterozigoto para a mutação 1627insG (canaleta 10),

indicando um possível diagnóstico molecular para este paciente. Assim como o paciente 2, os pacientes 3, 9, 10, 11, 13, 15 e 18 também apresentaram uma mobilidade em gel de poliacrilamida semelhante ao padrão obtido pela migração da fita simples de DNA de um paciente heterozigoto para 1627insG, sugerindo que a enfermidade provavelmente tenha se desenvolvido devido a este genótipo.



**Figura 6: SSCP do EXON 15: Canaletas 1,2,4 (pacientes 5, 7 e 14):** migração diferenciada das demais. **Canaleta 3:** controle normal para este exon. **Canaleta 10:** Controle heterozigoto para 1627 insG. **Canaleta 9 (paciente 2):** migração semelhante a canaleta 10. **Canaletas 13 e 14 (pacientes 1 e 16):** migração diferenciada. **Canaletas 5,6,7,8,11,12,15 (pacientes 4,6,8,12,15,17,19):** não apresentam alterações de migração neste exon.

identificar 5 novas mutações (Tabela 6) e confirmar duas mutações já descritas na literatura (R59H e 1622-1627insG). Foram seqüenciadas 9 amostras relativas ao exon 2 e 5 amostras relativas ao exon 15.

**Tabela 6:** Alteração provocada no DNA genômico dos pacientes cujas 5 novas mutações foram identificadas.

PACIENTE	ALTERAÇÃO CAUSADA NO DNA	MUTAÇÃO
5	TTC --> TAC	F63Y
9	CGG -->GGG	R38G
10	TAT --> TCT	Y36S
15	TAC -->TTC	Y64F
20	CGT -->TGT	R59C

O presente estudo possibilitou a identificação de 5 novas mutações, a genotipagem completa de 6 pacientes e a genotipagem parcial de 5 pacientes com gangliosidose GM1 (Tabela 7). O paciente 5 foi genotipado com a mutação F63Y, o paciente 9 com a mutação R38G, o paciente 10 com a Y36S, o paciente 15 com a Y64F e o paciente 20 com a mutação R59C (Figura 7).

**Tabela 7:** Status de investigação do genótipo dos 15 pacientes: Antes e Depois do presente trabalho.

PACIENTE	ANTES	DEPOIS
1	-	Alteração em SSCP nos exons 2,4,10,12,14,15,16
2	-	Genotipado: R59H/1627 insG
3	-	Genotipado: R59H/1627 insG
4	-	-
5	-	Mutação Nova: Heterozigoto F63Y e alteração nos exons 2,3,6,8e9,14,15
6	-	Genotipado: R59H/R59H
7	-	Alteração em SSCP nos exons 4,15
8	-	Alteração em SSCP no exon 7
9	-	Genotipado: R38G/1627insG
10	-	Genotipado: Y36S/1627insG
11	-	Heterozigoto 1627insG
12	-	Aleteração em SSCP no exon 4
13	-	Genotipado: R59H/1627 insG
14	-	Alteração em SSCP no exon 15
15	-	Heterozigoto Y64F e alteração em SSCP nos exons 2,4,10
16	-	Alteração em SSCP nos exons 5,14,15
17	-	Alteração em SSCP nos exons 6,7,10,14
18	-	Heterozigoto 1627insG e alteração nos exons 4,15
19	-	-
20	-	Heterozigoto R59C



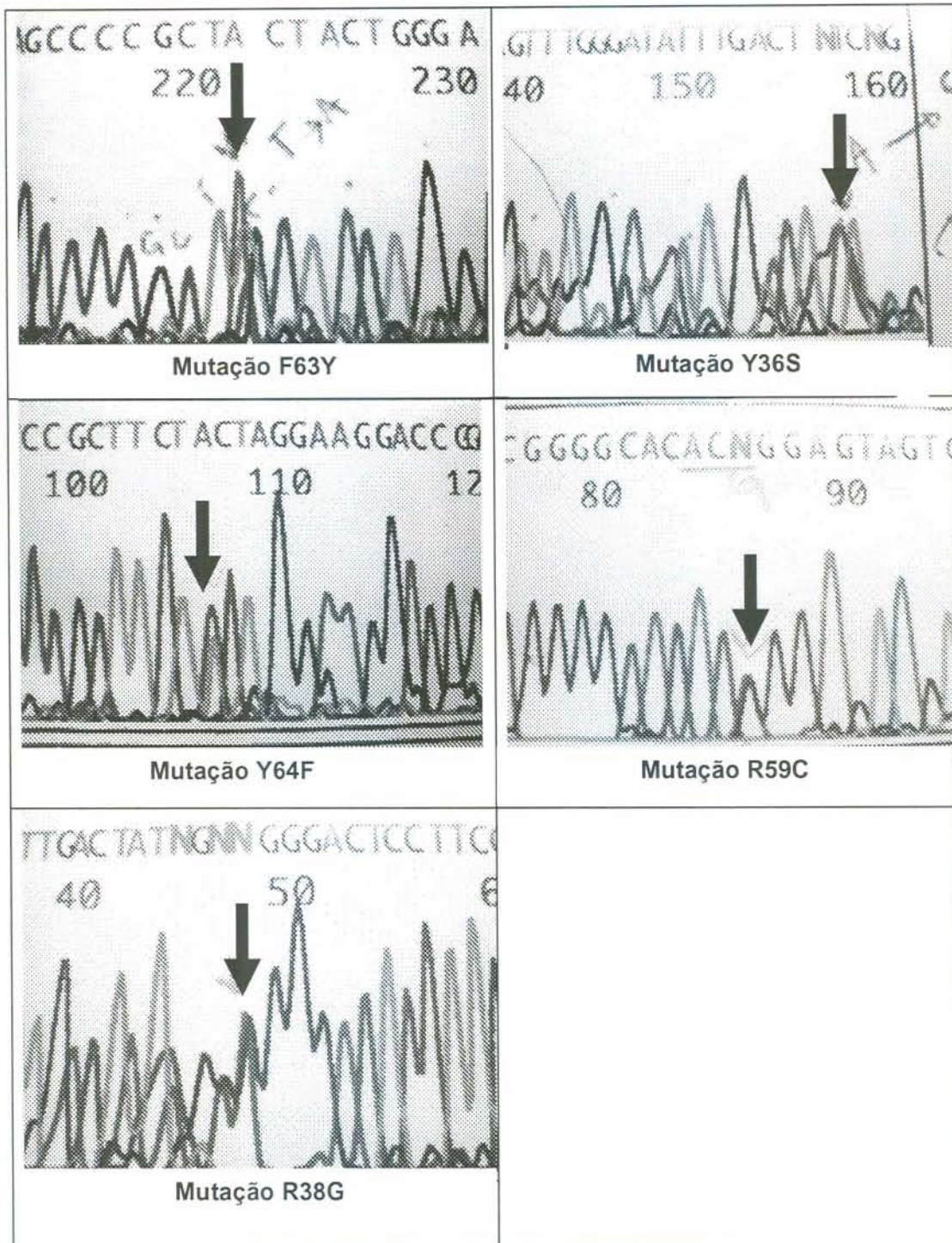


Figura 7: Cromatograma das cinco mutações novas identificadas. F63Y, R38G, Y36S, Y64F e R59C. a seta (↓) indica o local onde houve a mutação em um dos alelos.

## 5 DISCUSSÃO

A Técnica de SSCP tornou-se um método fácil e prático de detecção de novas mutações devido a sua boa sensibilidade. O método baseia-se na suposição de que uma alteração na seqüência de nucleotídeos causada por uma mutação afetaria a conformação da fita simples de DNA, resultando em uma mobilidade eletroforética alterada. Como as modificações causadas por uma mutação na conformação e no comportamento eletroforético da fita simples são imprevisíveis, alguns fatores podem ser experimentalmente modificados para aumentar a sensibilidade da técnica, tais como: tamanho da seqüência de DNA, temperatura, força iônica, pH e propriedades do gel (Jordanova et al., 1997)

A sensibilidade do SSCP tem revelado taxas de detecção de mutações que variam entre 30 e 90% (Orita et al., 1989; Michaud et al., 1992; Sheffield et al., 1993; Ravnik-Glavac et al., 1994) Estudos mostram que a sensibilidade do PCR-SSCP é inversamente proporcional ao tamanho do fragmento de DNA analisado. Os maiores índices são obtidos para fragmentos com tamanho entre 150 e 200 pb e/ou diferentes condições eletroforéticas (Sheffield et al., 1993; Jordanova et al., 1997).

A análise do perfil eletroforético da fita simples de DNA (SSCP), mostrou-se eficiente neste estudo, visto que foram encontradas 52 alterações de mobilidade na população estudada.

A análise conformacional de polimorfismos de fita simples (SSCP) foi realizada a temperatura ambiente. Como a temperatura é um parâmetro que influi na sensibilidade do método (Jordanova et. al., 1997), a simples modificação da

temperatura para 4° C poderia gerar perfis de migração completamente diferentes, elucidando ou não as mutações presentes no exon avaliado.

Em alguns casos, como os descritos por Matte et al, (2003), a realização de SSCP em todos os exons do gene da enzima em estudo não é suficiente para localizar novas mutações. O sequenciamento de todo o gene da enzima acaba sendo necessário. Provavelmente este é o caso dos pacientes 4 e 19 que não apresentaram alterações de migração de DNA fita simples para nenhum dos 16 exons estudados. Nos exons 2, cuja confirmação foi realizada por sequenciamento direto das nove alterações encontradas pelo SSCP, sete correspondiam a mutações patogênicas e duas eram normais para a região investigada. Estes dados sugerem uma sensibilidade de detecção do método de 80%. Entretanto estes dados podem estar sendo mascarados por mutações intrônicas ou muito próxima aos primers de amplificação do exon, o que elevaria esta sensibilidade.

Devido à dificuldade no uso do equipamento para realização do sequenciamento automático, foram realizados sequenciamentos somente dos exons cuja frequência de mutações é mais alta. No exon 2 foram seqüenciados as nove amostras cujos perfis de alteração em SSCP estavam presentes, já no exon 15 foram seqüenciados seis amostras de um total de doze.

As cinco novas mutações com troca de sentido descritas no presente trabalho F63Y, R38G, Y36S, Y64F e R59C assim como a mutação R59H (mutação de alta frequência) afetaram aminoácidos que são altamente conservados, quando comparados com as seqüências da  $\beta$ -galactosidase em gatos (GeneBank, AF006749), camundongos (Namba et al., 1990) e cães (Arhern-Rindell et al., 1996). Assim, podemos presumir que tais resíduos sejam

funcionalmente importantes para que a enzima desempenhe seu papel hidrolítico adequadamente (figura 8).

A análise dos dados mostra que o exon 2 e 15 foram os que apresentaram o maior número de alterações de migração de DNA fita simples (9 e 12 respectivamente). No exon 2 foram identificadas 5 novas mutações e no exon 15 identificada a mutação com maior frequência no estado (1627insG)

Grande parte das mutações patológicas descritas até hoje encontram-se principalmente nos exons 2, 3, 14 e 15. Boustany e colaboradores(1993) e Silva e colaboradores al., (1999) sugeriram que estas regiões seriam responsáveis pela parte catalítica e/ou regulatória da proteína Beta-galactosidase ácida.



**Figura 8:** Comparação da seqüência de aminoácidos da β-galactosidase ácida em diferentes espécies. (Baiotto, 2001)

A outra alteração encontrada neste estudo (1622-1627insG) causa mudanças na fase de leitura da seqüência da β-galactosidase, levando a uma terminação prematura da cadeia polipeptídica. Mutações como estas são necessariamente consideradas causadoras da doença, visto que há um

encurtamento da cadeia polipeptídica da proteína devido a geração de códons de terminação no RNA mensageiro. No caso da mutação 1622-1627insG, assim como nas mutações 641insT e 896insC (Silva et al., 1999) a inserção ocorre em regiões repetidas. Este fato pode ser explicado através do modelo de "pareamento errôneo por delise" ou "slipped mispairing", proposto por Cooper e Krawczak (1991).

As frequências das mutações de troca de sentido causando doenças genéticas tem um caráter não randômico. Em nível de DNA este caráter tem sido atribuído as variações do local onde as mutações ocorrem, por exemplo da presença ou ausência de CpG dinucleotídeos. A metilação do DNA no resíduo de citosina de dinucleotídeos CpG produz 5-metilcitosina, que resulta em uma mudança de citosina para timina por uma desaminação mediada por uma metilação. A metilação em regiões CpG tem importante papel na etiologia de doenças genéticas e atualmente é sugerido que 10 a 60% das mutações de ponto sejam causadas pelas transições mediadas por metilação CpG (Antonarakis et al., 2001; Krawczak et al., 1998). No caso da mutação R59C assim como a R59H, a seqüência do RNA mensageiro é **CCCG** e pode estar relacionada diretamente com a alta incidência de mutações neste sítio. Nas mutações R38G, Y36S, Y64F, F63Y, as regiões flaqueadoras do códon mutante também são constituídas por repetições de CG.

Em células normais, quando a enzima  $\beta$ -galactosidase chega ao compartimento endossomo-lisossomo, se associa com a Neuraminidase, proteína protetora Catepsina A e N-acetilglucosamina 6-sulfato sulfatase para formar um complexo estável responsável pela degradação de Gangliosídeo GM1 e de

Keratan Sulfato. A formação deste complexo é absolutamente essencial para que a enzima  $\beta$ -galactosidase tenha uma estabilidade e para que consiga sofrer todas as modificações pós-traducionais (Pshezhetsky et al.1996). A presença de uma mutação na enzima  $\beta$ -galactosidase reduz de forma dramática a interação desta com o complexo de degradação. Em mutações pontuais, como é o caso das mutações relatadas (F63Y, R38G, Y36S, Y64F e R59C) a gravidade da doença pode estar relacionada com a alteração provocada pela troca de características do aminoácido inserido em virtude da mutação. No caso da mutação R59C, a troca de um aminoácido hidrofílico, com um grupamento lateral carregado positivamente (Arginina) por um aminoácido com características intermediárias de solubilidade e cargas (Cisteína) pode ser responsável pelas manifestações patológicas da enfermidades e pela dificuldade ou inabilidade de clivar o substrato Gangliosídeo GM1 assim como outros gliconjugados contendo ligação beta-galactosídica. O mesmo tipo de alteração ocorre na mutação R38G. Na mutação F63Y, a substituição de uma fenilalanina por uma tirosina muda esta porção da proteína com uma característica hidrofílica da fenilalanina a uma característica intermediária de solubilidade proveniente da tirosina. O contrário ocorre na mutação Y64F onde um aminoácido com característica intermediária de solubilidade é substituído por um aminoácido com características hidrofílicas. Na mutação Y36S a substituição de uma tirosina por uma Serina provavelmente pouco significará no âmbito de características desta porção proteica, visto que ambos possuem características intermediárias de solubilidade.

Apesar do grande empenho em tentar determinar todos os alelos causadores da Gangliosidose GM1, foi possível encontrar, durante a realização deste trabalho 17 alelos causadores da efermidade.

O presente estudo serviu de suporte para o diagnóstico molecular, visto que possibilitou a identificação de cinco novas mutações, e a genotipagem completa de seis pacientes e a genotipagem parcial de cinco pacientes com gangliosidose GM1. Ainda que alguns pacientes ainda não tenham o diagnóstico molecular definido neste ponto, houve uma grande evolução e um direcionamento dos resultados, pois o método de SSCP foi capaz de realizar uma triagem inicial visto que os exons cujos perfis de migração de DNA fita simples foram idênticos a de controles normais foram descartados da possibilidade de carrear alterações. Esta estratégia de diagnóstico molecular além de ser extremamente factível e confiável, é uma técnica que viabiliza este tipo de análise em laboratórios de médio e pequeno porte, em virtude dos custos reduzidos em relação ao sequenciamento direto de todos os exons do gene. Estes dados laboratoriais servirão para um melhor acompanhamento destes pacientes visando o aconselhamento genético e diagnóstico pré-natal.

## 6 CONCLUSÕES

O presente trabalho teve como principal objetivo desenvolver suporte para a realização da análise molecular do gene da enzima  $\beta$ -galactosidase ácida, deficiente em pacientes com Gangliosidose GM1. A realização da técnica de identificação de polimorfismo conformacional de fita simples de DNA (SSCP) seguida de sequenciamento direto dos exons cujo perfil em SSCP se mostrou alterado direcionou o diagnóstico molecular de pacientes com Gangliosidose GM1 diagnosticados no Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. A análise dos dados do presente trabalho levou-nos a concluir que:

1. um protocolo de triagem de Mutações por SSCP para os 16 exons do gene da enzima  $\beta$ -galactosidase ácida foi padronizado. Este protocolo serve de suporte para o desenvolvimento de estudos de alterações gênicas no gene GLB1;
2. a triagem de mutações através da análise do perfil de migração de DNA fita simples (SSCP) mostrou ser um método satisfatório para o diagnóstico molecular quando acompanhado de um método confirmatório;
3. o presente trabalho contribuiu para a genotipagem completa de seis pacientes, genotipagem parcial de cinco pacientes e levou-nos a



identificação de cinco novas mutações ainda não descritas na literatura (F63Y, R38G, Y36S, Y64F e R59C).

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Arhern-Rindell AJ, Kretz KA, O'Brien JS (1996) Comparison of the canine and human acid beta-galactosidase gene. *Am J Med Genet*, 63:340-345.

Antonarakis SE, Krawczak M, Cooper DN (2001) The nature and mechanisms of human gene mutation. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. New York: McGraw-Hill, :343–77.

Bachmair, A.; Finley, D & Varshavsky, A (1986) In vivo half-life of a protein is a function of its aminoterminal residue. *Science*. 234:179-186.

Baiotto, C (2001) Gangliosidose GM1 tipo 1: Estudo de duas mutações frequentes no sul do Brasil. Dissertação de mestrado do curso de pós graduação em genética e biologia molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre

Beattie RM & Harvey D. Extensive and unusual Mongolian blue spots in a child with GM1 gangliosidosis type one. *J Royal Soc Med* 1992; **85**: 574 575.

Blobel, G (1987) Protein Translocation into the endoplasmic reticulum. *Hepatology*. 7:26s-29s.

Callahan JW (1999) Molecular Basis of GM1 Gangliosidosis and Morquio disease type B. Structures-function studies of lysosomal  $\beta$ -galactosidase and the nonlysosomal  $\beta$ -galactosidase-like protein. *Biochem Biophys Acta* 1445: 85-103.

Cheng SH, Smith AE (2003) Gene Therapy progress and prospects: gene therapy of lysosomal storage disorders. *Gene Therapy* 10:1275-1281.

Cohn RM, Roth KS (1983) Catastrophic diseases presenting in the newborn period. In: *Metabolic disease: a guide to early recognition*. Philadelphia: WB Saunders; 3-6.

Colombo M; Cabello F. (2003) Errores innatos del metabolismo lisosomal. In: Colombo MC, Carnejo VE, Raimann EB (eds) *Errores innatos en el metabolismo del niño*, 2th ed. Santiago do Chile

D'Azzo A, Hoogeveen A, Reuser AJJ, Robinson D, Galijaard H (1982) Molecular defect in combined  $\beta$ -galactosidase and neuraminidase deficiency in man. *Proc Natl Sci*, 79: 4535-4539

DeMarchi JM, Caskey CT, Richards CS (1996) Population-specific screening by mutation analysis for disease frequent in Ashkenazi Jews. *Hum Mutat*, 8:116-125.

- Derry DM, Fawcett JS, Andermann F, Wolfe LS (1968) Late Infantile Systemic Lipidosis. Major monosialogangliosidosis. Delineation of two types. *Neurology*, 18:340-348.
- Factor, SM; Bienpica, L.; Goldfisher, S. (1978) Coronary intimal sclerosis in Morquio's Syndrome. *Virchovs. Arch A. Pathol Anat Histol.* 379: 1-10.
- Frost RG, Holmes EW, Norden AGW, O'Brien JS (1978) Characterization of purified human liver acid  $\beta$ -galactosidase A2 and A3. *Biochem J*, 175:181-182.
- Gieselmann, U. (1995). Review. Lysosomal storage diseases. *Biochem. Biophys. Acta.* 1270:103-136.
- Giugliani R, Dutra JC, Pereira ML, Rotta N, Drachler Mde L, Ohlweiller L, Pina Neto JM, Pinheiro CE, Breda DJ. (1985) GM1 gangliosidosis: clinical and laboratory findings in eight families. *Hum Genet.* 70(4):347-54.
- Gonzalez-Noriega, A.; Grubb, JH; Fallad, V; Sly, WS (1980) Chloroquine inhibits lysosomal enzyme pinocytosis and enhances lysosomal enzyme secretion by impaired receptor recycling. *J. Cell. Biol.* 85:839-852.
- Hasilik, A(1980) Biosynthesis of lysosomal enzymes. *Trends. Biochem. Sciences.* 5:237-240.

- Ho MW & O'Brien JS (1971) Differential effect of chloride ions on  $\beta$ -galactosidase isoenzymes: a method for separate assay. *Clin Chem Acta*, 32: 443-450.
- Hoesksema HL, Van Diggelen OP, Galjaard H (1979) Intergenic complementation after fusion of fibroblasts from different patients with  $\beta$ -galactosidase deficiency. *Biochem Biophys Acta*, 566: 72-79.
- Hoogeveen AT, Verheijen FW, Galjaard H (1983) The relation between human lysosomal  $\beta$ -galactosidase and its protective protein. *J. Biol Chem*, 258: 12143-12146.
- Jeyakumar M, Thomas R, Elliot-Smith DA, Van der Spoel AC, D'azzo A, Perry VH, Butters TD, Dwek RA, Platt FM. (2003) Central nervous system inflammation is a hallmark of pathogenesis in mouse models of GM1 and GM2 gangliosidosis. *Brain* 126:974-987.
- Jimenez HK, Schuchman EH (2003) Ex vivo gene therapy using bone marrow-derived cells: combined effects of intracerebral and intravenous transplantation in a mouse model of Niemann-Pick disease. *Mol Ther* 8(6):876-85.
- Jordanova A, Kalaydjieva L, Savov A, Claustres M, Schwarz M, Estivill X, Angelicheva D, Haworth A, Casals T, Kremensky I (1997) SSCP analysis: a blind sensitivity trial. *Hum Mutat*, 10:65-70.

- Jorde LB, Carey JC, Bamshad MJ, White RL (2000) Mapeamento Gênico e clonagem. In: Genética Médica. 2 ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, pp. 139-167.
- Junqueira LC & Carneiro J (1997) Síntese de macromoléculas. In: Biologia Celular e Molecular. 6º ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, pp. 194-214.
- Kim, PS; Arvan, P (1998) Endocrinopathies in the family of endoplasmic reticulum storage diseases: disorders of protein trafficking and the role of ER molecular chaperones. *Endocrine Ver.* 19:173-202.
- Knop M, Schiffer HH, Rupp S, Wolf DH (1993) Vacuolar/lysosomal proteolysis: proteases, substrates, mechanisms. *J. Biol. Chem.* 130:10125-10129
- Kornfeld S, Lobel P, Dahms NM (1989) Mannose-6-phosphate receptor and lysosomal enzyme targeting. *J. Biol. Chem.* 264:12115-12118
- Kornfeld & Mellmann.(1989) The biogenesis of lysosomes. *Annu Ver Cell Biol.* 5: 483-525.
- Krawczak M, Ball EV, Cooper DN. Neighboring-nucleotide effects on the rates of germ-line single-base-pair substitution in human genes. (1998) *Am J Hum Genet*;63:474–88.

- Li SC & Li YT (1976) An Activator stimulating the enzymic hydrolysis of sphingoglycolipids. *J Biol Chem*, 251:1159-1163
- Lodish, FH (1988) Transport of secretory and membrane glycoproteins from the rough endoplasmic reticulum to the golgi – A rate limiting step in protein maturation and secretion. *J. Biol. Chem.* 263(5):2107-2110.
- Loonen MCB, Lugt L, Franke CL (1974) Angiokeratoma corporis diffusum and lysosomal enzyme deficiency (Letter). *Lancet*, 2:785.
- Matsuda J, Susuki O, Oshima A, Yamamoto Y, Noguchi A, Takimoto K, Itoh M, Matsuzaki Y, Yasuda Y, Ogawa S, Sakata Y, Nanba E, Higaki K, Ogawa Y, Tominaga L, Ohno K, Iwasaki H, Watanabe H, Brandy RO, Suzuki Y (2003) Chemical chaperone therapy for brain pathology in GM1-gangliosidosis. *PNAS* 100:15912-15917.
- Matte U, Yogalingam G, Brooks, D, Leistner S, Schwartz I, Lima L, Norato D, Brum J, Beesley C, Winchester B, Giugliani R, Hopwood J (2003) Identification and characterization of 13 new mutations in mucopolysaccharidosis type I patients *Hum Molecul. Genetics* Oct 78: 37-43.
- Meikle PJ, Ravenscroft EM, Yan M, Chataway TK, Carlsson SR, Brooks DA, Hopwood JJ. (1997) Newborn screening for lysosomal storage Disorders:

essential for effective therapy. Proceedings of 7<sup>th</sup> International Congress of Inborn Errors of Metabolism. May 21-25, Viena, Austria.

Michaud J, Brody LC, Steel G, Fontaine G, Martin LC, Valle D, Mitchell G (1992) Single-Strand conformational polymorphism analysis: efficacy of detection of point mutations in the human ornithine o-aminotrasferase gene. *Genomics*, 10:389-394.

Miller, R, Nishimoto J, Nanda E, Inui K, Okada S, (1988) Dna Extraction, a vision. *Am J Hum Genet*;63:474–88.

Morreau H, Bonten E, Zhou XY, D'Azzo A (1991) Organization of the gene encoding human lysossomal beta-galactosidase. *DNA Cell Biol*, 10:495-504.

Morreau H, Galijart NJ, Willemsen R, Gillemans N Shou XY, D'Azzo (1992) Human lysossomal protective protein: glycosilation, intracellular transport and association with  $\beta$ -galactosidase in endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*, 267: 17949-17956.

Morreau H, Galjart NJ, Gillemans N, Willemsen R, Van der Horst GTJ, D'Azzo A (1989) Alternative splicing of beta-galactosidase-related protein. *J Biol Chem*, 264: 20663-20665.



- Morrone A, Bardelli T, Donati MA, Giorgi M, Di Rocco M, Gatti R, Parini R, Ricci R, Taddeucci G, D'Azzo A, Zammarchi E (2000) Beta-galactosidase gene mutations affecting the lysosomal enzyme and the elastin-binding protein in GM1-Gangliosidosis patients with cardiac involvement. *Hum Mut.* 15:354-366
- Morrone A, Bardelli T, Danati MA, Giorgi M, Di Rocco R, Gatti R, Taddeucci G, Ricci R, D'Azzo A (1997) Identification of new mutations in six Italian patients affected by a variant form of infantile GM1 Gangliosidosis with severe cardiomyopathy. *Am J Hum Genet.* 61: A528 (abstract)
- Namba E & Suzuki K (1990) Molecular cloning of mouse acid beta-galactosidase cDNA: sequence, expression of catalytic activity and comparison with the human enzyme. *Biochem biophys Res Comm*, 173:141-148.
- Nelson, D, Cox, M, (1992) *Inherited Human Diseases Resulting from abnormal accumulations of Membrane Lipids. Principles of biochemistry* New York, 3<sup>o</sup> ed. pg. 375.
- Neufeld EF (1991) Lysosomal Storage Diseases. *Ann N Y Acad Sci*, 679: 87-109.
- Nishimoto J, Nanda E, Inui K, Okada S, Suzuki K (1991) GM1-Gangliosidosis (genetic beta-galactosidase deficiency): Identification of four mutations in

- different clinical phenotypes among Japanese patients. *Am J Hum Genet*, 49: 566-574.
- Norden AGW, Tennant LL, O'Brien JS (1974) GM1 Ganglioside  $\beta$ -galactosidase A. Purification and studies of the enzyme from human liver. *J. Biol. Chem*, 249: 7969-7976.
- O'Brien JS (1983) Molecular genetics of GM1 beta-galactosidase. *Clin. Genet*, 8:303-313.
- O'Brien JS (1989)  $\beta$ -galactosidase deficiencies (GM1-gangliosidosis, Galactosialidosis and Morkio Syndrome type B; Ganglioside sialidase deficiency (Mucopolipidosis type IV). In Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle DV (eds): *The metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. 7<sup>th</sup> ed., New York: McGraw-Hill. p. 1797-1806.
- O'Brien JS, Ho MW, Winson JF, Myers G, Opitz JM, Zurhein GM, Spranger JW, Hartmann HÁ, Haneberg B, Grosse FR (1972) Juvenile GM1-Gangliosidosis: Clinical, pathological, chemical and enzymatic studies. *Clin. Genet*, 3:411-434.
- O'Brien JS, Kretz KA, Dewji N, Wenger DA, Esch F, Fluharty AL (1988) Coding of two sphingolipid activator proteins (SAP-1 and SAP-2) by the same genetic locus. *Science*, 241:1098-1101.

- O'Brien JS, Stern MB, Landing GH, Donnel GN (1965) Generalized Gangliosidosis. Another inborn error of metabolism? *Am J Dis Child*, 109:338-346.
- Okada S & O'Brien JS. (1968) Generalized Gangliosidosis: beta-galactosidase deficiency. *Science*, 160:1002-1004.
- Okomura-Oho Y, Zhang S, Hilson W, Hinek A, Callahan JW(1996) Early proteolytic cleavage with loss of a C-terminal fragment underlies altered processing of the  $\beta$ -galactosidase precursor in galactosialidosis. *Biochem J*, 313:787-794.
- Orita M Iwahana H, Kana Zawa H, Sekija T (1989) Detection of poly of human DNA by gel electrophoresis as single strand conformation polymorphism. *Proc Natl Acad Sci USA*, 86: 2766-2770.
- Oshima A, Tsuji A. Nagao Y, Sakuraba H, Suzuki Y (1988) Cloning, sequencing and expression of cDNA for human beta-galactosidase. *Biochem Biophys Res Commun*, 157: 238-244.
- Oshima A, Yoshida K, Shimmoto M, Fukuhara Y, Sakuraba H, Suzuki (1991) Human beta-galactosidase gene mutations in Morquio B disease. *Am J Hum Genet*, 49:1091-1093.
- Pfeffer, SR & Rothman, JE (1987) Biosynthetic protein transport and sorting by the endoplasmic reticulum and golgi. *Ann. Rev. Biochem.* 56:829-852.

- Pshezhetsky AV & Potier M (1992) Regulation of the GM1-gangliosidosis supramolecular structure and catalytic activity. *Biochem Biophys Acta*, 1122: 154-160.
- Pshezhetsky, M. Potier, (1996) Association of N-Acetylgalactosamine-6-sulfate Sulfatase with the multienzyme lysosomal Complex of b-galactosidase, Cathepsin A and a-Neuraminidase : possible implication for intralysosomal catabolism of keratan sulfate *J. Biol. Chem.* 271 28359–28365.
- Rapoport, TA (1990) Protein Transport Across the ER membrane. *Trends. Biochem Sci.* 15:355-358.
- Ravnik-Glavac M, Glavac D, Dean M (1994) Sensitivity of single-strand conformation polymorphism and heteroduplex method for mutation detection in the cystic fibrosis gene. *Hum Mol Genet*, 3:801-807.
- Rosemberg H, Freeman TC, Li MD, Gordon BL, Jung JH, Finlay JP, Roy PL, Grover D, Spence M (1985) Cardiac involvement in diseases characterized by beta-galactosidase deficiency. *J. Pediatr* 106:78-80.
- Salvetti A & Danos O (1995) Gene therapy of lysosomal storage disorders. *Br. Med Bull.* 51:106-122.

Seashore MR & Wappner (1996) Inborn errors of metabolism. In: Seashore MR & Wappner eds. Genetics in primary care and clinical medicine. Stanford: Appleton and Lange. P. 241-256.

Sena-Esteves M, Camp SM, Alroy J, Breakefield XO, Kaye EM (2000) Correction of acid beta-galactosidase deficiency in GM1 gangliosidosis human fibroblasts by retrovirus vector-mediated gene transfer: higher efficiency of release and cross-correction by the murine enzyme. *Hum Gene Ther*, 11(5):715-727.

Severi F, Magrini U, Tttamanti G, Bianchi E, Lanzi G (1971) Infantile GM1 gangliosidosis. Histochemical, ultrastructural and biochemical studies. *Helv Pediatr Acta* 26: 192-209.

Severini MH; Silva CMD; Sopelsa A; Coelho, J; Giugliani R (1999). High frequency of type 1 GM1 gangliosidosis in Southern Brazil. *Clin Genet* 56:168-169.

Sheffield VC, Beck JS Kwitek A, Sandstrom DV, Stone EM (1993) The sensitivity of single-strand conformation polymorphism analysis for the detection of single base substitutions. *Genomics*, 16:325-332.

Sheibe R, Hein K, Wenzel KW (1990) Lysosomal  $\beta$ -galactosidase from rat liver purification, molecular forms and association with neuraminidase. *Biomed Biochem. Acta*, 49: 547-556.

Silva CM, Severini MH, Sopelsa A, Coelho JC, Zaha A, D'Azzo A, Giugliani R.(1999) Six novel beta-galactosidase gene mutations in Brazilian patients with GM1-gangliosidosis. *Human Mutation*. 13(5): 401-409.

Singer HS & Nandkervis GA, Shaffer IA (1972) Leukocyte beta-galactosidase activity in the diagnosis of generalized GM1 Gangliosidosis. *Pediatrics*, 49:352-357.

Sips HJ (1985) The chromosomal localization of human  $\beta$ -galactosidase revisited: a locus for  $\beta$ -galactosidase on human chromosome 3 and for its protective protein on human chromosome 22. *Hum. Genet* 69:340-344.

Sopelsa AMI; Severini MHA; Silva CMD; Tobo PR; Giugliani R; Coelho JC (2000) Characterization of beta-galactosidase in leucocytes and fibroblasts of GM1 Gangliosidosis heterozygous compared to normal subjects. *Clinical Biochemistry* 33: 125-129.

Suzuki Y, Sakaraba H, Oshima A. (1995)  $\beta$ -galactosidase deficiency ( $\beta$ -galactosidosis): GM1 Gangliosidosis and Morquio B Disease. In Scriver CR, Beaudet AI, Sly WS, Valle DV (eds): *The metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease*. 7<sup>th</sup> ed, New York: McGraw-Hill. P.2785-2823.

- Targer JM, Jonsson LVM, Aerts J, Elferink R, Schram AW, Erickson AH, Barranger JA. (1984) Metabolic consequences of genetic defects in lysosomes. *Biochem Soc Biochem Soc Trans*, 12:902-905.
- Tessitore A, Martin MP, Sano R, Ma Y, Mann L, Ingrassia A, Laywell ED, Steindler DA, Hendershot LM, D'Azzo A (2004) GM1-Ganglioside-Mediated activation of the unfolded protein response causes neuronal death in a neurodegenerative gangliosidosis. *Molecular cell* 15:753-766.
- Tycko, B; Maxfield, FR (1982) Rapid acidification of endocytic vesicles alpha2-macroglobulin. *Cell*. 28:643-651.
- Wenger DA & Inui K (1984) Studies on the sphingolipid activator protein for the enzymatic hydrolysis of GM1-ganglioside and sulfatide. In: Barranger JA & Brady O (eds) *Molecular Basis of Lysosomal Storage Disorders*. New York Academic. P. 61.
- Whitley CB. The mucopolysaccharidoses. In: Beighton P, ed. *McKusick's Hereditary Disorders of Connective Tissue*, 5th edn. St Louis: Mosby Year Book Inc, 1993: 470-471.
- Vainer MT & Rousson R. Les-Neurolipidoses. In: David M, Floret D, eds. *Pédiatrie*. Villeurbanne: Simep, 1984: 729.

- Yamamoto Y, Fujie M, Nishimura K, (1982) The interrelation between high and low molecular forms of GM1  $\beta$ -galactosidase purified from porcine spleen. *J. Biochem*, 92: 12-21.
- Yamamoto Y, Hake CA, Martin BM, Kretz KA, Ahernrindell AJ, Naylor SL, Mudd M, O'Brien JS (1990) Isolation, characterization and mapping of human acid beta-galactosidase cDNA. *DNA Cell Biol*, 9:119-127.
- Yoshida K, Oshima A, Shimmoto M, Fukuhara Y, Sakuraba H, Yanagisawa N, Suzuki Y (1991) Human beta-galactosidase gene mutations in GM1-gangliosidosis: a common mutation among Japanese adult/chronic cases. *Am J. Hum Genet*, 49:328-332.



# 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](#)