

MARCELO PASCHOALETE CARLIN

***DETERMINAÇÃO DE MUTAÇÕES NOS GENES G6PC E G6PT1 EM
PACIENTES COM GLICOGENOSES TIPO IA E IB***

**CAMPINAS
2011**

MARCELO PASCHOALETE CARLIN

***DETERMINAÇÃO DE MUTAÇÕES NOS GENES G6PC E G6PT1 EM
PACIENTES COM GLICOGENOSES TIPO IA E IB***

*Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação da
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual
de Campinas para obtenção do título de Mestre em Ciências
Médicas, área de concentração em Ciências Biomédicas.*

Orientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo Steiner

Co-orientadora: Profa. Dra. Carmen Sílvia Bertuzzo

CAMPINAS

Unicamp

2011

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecária: Rosana Evangelista Poderoso – CRB-8ª / 6652

C194d Carlin, Marcelo Paschoalete
 Determinação de mutações nos genes G6PC e G6PT1 em
 pacientes com glicogenoses tipo Ia e Ib. /Marcelo Paschoalete Carlin --
 Campinas, SP : [s.n.], 2011

Orientador : Carlos Eduardo Steiner
Co-orientador: Carmen Silvia Bertuzzo
Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas,
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Glicogênio. 2. Doença de depósito de glicogênio. 3. Mutação.
4. Sequenciamento de DNA. I. Steiner, Carlos Eduardo. II.
Bertuzzo, Carmen Silvia. III. Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Título em inglês: Determination of mutations in *G6PC* and *G6PT1* genes in patients with glycogen storage disease type Ia and Ib

Keywords: • Glycogen
 • Glycogen storage disease
 • Mutation
 • DNA sequencing

Titulação: Mestre em Ciências Médicas
Área de Concentração: Ciências Biomédicas

Banca examinadora:

Prof. Dr. Carlos Eduardo Steiner
Prof. Dr. Silvana Francisco Boldrini
Prof. Dr. Cláudia Vianna Maurer Morelli

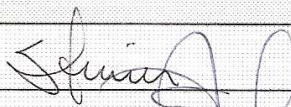
Data da defesa: 28-02-2011

Banca examinadora da Dissertação de Mestrado
Marcelo Paschoalete Carlin

Orientador(a): Prof. Dr. Carlos Eduardo Steiner

Membros:

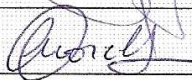
1. Prof. Dr. Carlos Eduardo Steiner -



2. Profa. Dra. Silvana Boldrini Francisco -



3. Profa. Dra. Cláudia Vianna Maurer Morelli -



Curso de pós-graduação em Ciências Biomédicas da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas.

Data: 28/02/2011

*“Poucos terão a grandeza para dobrar a história,
mas cada um de nós pode trabalhar para mudar
uma pequena parte dos acontecimentos.
A história é feita de inúmeros
atos de coragem e crença”.*

(Robert F. Kennedy)

*Aos meus pais,
a quem devo tudo o que sou hoje
e dedicarei todas as minhas vitórias.
Nos ensinamentos da vida, foram mestres.
A dedicação, atenção e orientação,
possibilitaram minha formação pessoal.
Como lição, aprendi a ser responsável e humano.
Aprendi a lutar e enfrentar obstáculos.
Acreditaram em mim e hoje sou fruto dessa confiança.*

À minha irmã Renata que esteve sempre ao meu lado apoiando.

*À minha noiva Ana Paula.
O amor é paciente. O amor é gentil.
Não é ciumento, não se envaidece, não é rude.
Não busca seu próprio interesse, não se exaspera.
Não se felicita do mal, não se satisfaz com a injustiça.
Mas se alegra com a verdade.
Suporta a tudo, tudo crê, tem esperança em tudo.
O amor nunca falha.*

AGRADECIMENTOS

A Deus pela força nos momentos em que mais precisei.

Gostaria de agradecer a todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho.

Ao Prof. Dr. Carlos Eduardo Steiner pela orientação e atenção em todos os momentos. Pela amizade, confiança e oportunidade de crescimento profissional. Peça fundamental para a conclusão desse trabalho.

À Profa. Dra. Carmen Sílvia Bertuzzo, exemplo de academicismo a ser seguido, pela co-orientação e amizade.

Aos membros da banca examinadora Dra. Cláudia Morelli, Dra. Silvana Boldrini, Dr. Fábio Rossi e Dra. Kelly Cristina Malavazi-Piza, pelas sugestões que enriqueceram este trabalho.

À Dra Adriana Maria Alves de Tommaso pelo esforço clínico e obtenção dos pacientes.

À Lidiane Rueda que me proporcionou o passo inicial na concretização dessa realização, além da amizade, torcida e companheirismo durante todos esses anos.

À Marcella Baptista pela amizade e ajuda na parte laboratorial.

À Luciana Bonadia por me dar idéias, tirar dúvidas e correções. À Marilza Santos pela ajuda com as coletas de sangue. Além da enorme amizade que juntos criamos.

Aos pacientes e familiares que aceitaram a participar do estudo.

Aos demais colegas de laboratório, com os quais convivi durante esses anos e que contribuíram não apenas com apoio técnico e científico, mas também com amizade e momentos de descontração: Tânia, Daniel, Madalena, Milena, Estela, Daniela, Ilária, Simone, Marina, Fábio, Rodrigo, Bibiana, Lucila, Renato, Karina, Talita e Tammy.

Cada pessoa que passa em nossa vida é única. Sempre deixa um pouco de si e leva um pouco de nós. Há os que levaram muito, mas não há os que não deixaram nada. Esta é a maior responsabilidade de nossa vida e a prova evidente de que não nos encontramos por acaso.

	PÁG.
RESUMO	xvi
ABSTRACT	xviii
1. INTRODUÇÃO	20
1.1 ERROS INATOS DO METABOLISMO.....	21
1.2 GLICOGENOSES.....	23
1.3 GLICOGENOSE TIPO I.....	27
1.4 GLICOGENOSE DO TIPO IA (DOENÇA DE VON GIERKE).....	31
1.5 GLICOGENOSE DO TIPO IB.....	37
1.6 DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO DOS SUBTIPOS IA E IB.....	40
2. OBJETIVOS	47
2.1 OBJETIVO GERAL.....	48
2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO.....	48
3. MATERIAIS E MÉTODOS	49
3.1 ASPECTOS ÉTICOS.....	50
3.2 CASUÍSTICA.....	50
3.3 ESTRATÉGIA UTILIZADA.....	52
3.4 DESCRIÇÕES DOS MÉTODOS.....	52
3.4.1. Extração de DNA.....	52
3.4.2. Amplificação por PCR.....	53
3.4.3. Sequenciamento automático.....	56
3.4.4. Análise de restrição.....	57
4. RESULTADOS	58
4.1 AMPLIFICAÇÃO DOS <i>EXONS</i>	59
4.2 RASTREAMENTO DE MUTAÇÕES.....	60
4.2.1. Gene <i>G6PC</i>	60
4.2.2. Gene <i>G6PT1</i>	67

5.	DISCUSSÃO.....	72
	5.1 MUTAÇÕES ENCONTRADAS NO GENE <i>G6PC</i>	75
	5.1.1. Mutação G68R.....	75
	5.1.2. Mutação R83C.....	75
	5.1.3. Mutação Q347X.....	76
	5.2 MUTAÇÕES ENCONTRADAS NO GENE <i>G6PT1</i>	77
	5.2.1. Mutação G149E.....	77
	5.2.2. Mutação frameshift 1338_1339insT.....	77
6.	CONCLUSÕES.....	79
7.	BIBLIOGRAFIA.....	81
8.	ANEXOS.....	95
	8.1 APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA.....	96
	8.2 TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....	97

LISTA DE ABREVIATURAS

ATP	trifosfato de adenosina
ddNTPs	didesoxinucleotídeos
DNA	ácido desoxirribonucleico
dNTPs	desoxinucleotídeos
EIM	Erros inatos do metabolismo
G-1-P	glicose-1-fosfato
G-6-P	glicose-6-fosfato
G6Pase	enzima glicose-6-fosfatase
<i>G6PC</i>	gene que codifica a enzima glicose 6-fosfatase
<i>G6PT1</i>	gene que codifica a proteína glicose 6-fosfato translocase
GSD	Doença de depósito de glicogênio (<i>Glycogen Storage Disease</i>)
GSDI	Glicogenose do tipo I
GSDIa	Glicogenose do tipo Ia
GSDIb	Glicogenose do tipo Ib
ITU	infecção do trato urinário
LDL	lipoproteína de baixa densidade
mRNA	ácido ribonucleico mensageiro
NADH	nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido
NADP	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
pb	pares de bases
PCR	reação em cadeia da polimerase (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
RE	retículo endoplasmático
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphisms</i>
RSB	Tris/KCL/MgCL
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SNP	Polimorfismo de nucleotídeo único (<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>)
Ta	temperatura de anelamento
Taq	DNA polimerase de <i>Thermus aquaticus</i>
Tm	temperatura de fusão (melting)
UDPG	uridina difosfoglicose
VLDL	lipoproteína de densidade muito baixa

	PÁG.
Tabela 1 - Classificação das glicogenoses.....	26
Tabela 2 - Indivíduos incluídos no estudo.....	51
Tabela 3 - Sequência dos <i>primers</i> usados para amplificação	54
Tabela 4 – Resumo das alterações detectadas no gene <i>G6PC</i>	60
Tabela 5 – Genótipo dos pacientes com relação às alterações encontradas no gene <i>G6PC</i>	66
Tabela 6 – Resumo das alterações detectadas no gene <i>G6PT1</i>	67
Tabela 7 – Genótipo dos pacientes com relação às alterações encontradas no gene <i>G6PT1</i>	71

	PÁG.
Figura 1 - Via metabólica hipotética.....	21
Figura 2 - Hepatócitos normais <i>versus</i> anormais (glicogenose).....	28
Figura 3 - Modelo do complexo enzimático da G6Pase.....	29
Figura 4 - Estrutura proteica da G6Pase.....	30
Figura 5 - Representação da estrutura do gene <i>G6PC</i>	32
Figura 6 - Consequências metabólicas provocadas pela glicogenose tipo I.....	34
Figura 7 - Representação da estrutura do gene <i>G6PT1</i>	38
Figura 8 - Fluxograma para o diagnóstico das GSD Ia e Ib.....	42
Figura 9 - Ciclo utilizado na <i>touchdown</i> PCR.....	56
Figura 10 - Ciclos utilizados na reação de sequenciamento.....	56
Figura 11 - Amplificação dos cinco <i>exons</i> do gene <i>G6PC</i> através da PCR.....	59
Figura 12 - Amplificação dos 10 <i>exons</i> do gene <i>G6PT1</i> através da reação da PCR.....	59
Figura 13 - Eletroferograma mostrando a troca da base G por A (G68R).....	61
Figura 14 - Eletroferograma mostrando a troca da base C por T (R83C).....	62
Figura 15 - Eletroferograma mostrando a troca da base C por T (Q347X).....	63
Figura 16 - Eletroferograma mostrando a troca da base G por A (c.432 G>A).....	64
Figura 17 - Eletroferograma mostrando a troca da base T por C (c.1176T>C).....	65
Figura 18 - Eletroferograma mostrando a troca da base G por A (G149E).....	68

Figura 19 -	Eletroferograma mostrando a inserção em homozigose.....	69
Figura 20 -	Eletroforese em gel de acrilamida 12% mostrando a digestão enzimática da inserção 1338_1339insT.....	69
Figura 21 -	Eletroferograma mostrando a troca da base G por A (c.1287G>A).....	70
Figura 22 -	Eletroferograma mostrando a troca da base C por T (c.1076-28C>T).....	70

RESUMO

A transformação de glicogênio em glicose acontece através de reações químicas realizadas por enzimas específicas e uma deficiência em uma delas leva ao acúmulo de glicogênio, resultando em distúrbios hereditários conhecidos como doenças de depósito de glicogênio (GSD, da sigla em inglês), ou glicogenoses. A glicogenose tipo I (GSDI), responsável por mais de 90% dos casos, é causada pela deficiência de G6Pase, enzima chave na homeostase da glicose sanguínea. Seu complexo enzimático é constituído por duas subunidades (catalítica e translocase) que determinam os subtipos Ia e Ib.

A GSDIa, também conhecida como doença de von Gierke, é a mais comum das GSDI com 80 a 90% dos casos e corresponde a uma deficiência na sub-unidade catalítica da G6Pase. A GSDIb é a segunda forma mais prevalente e mais grave. É resultante da deficiência da glicose-6-fosfato translocase que transporta a glicose-6-fosfato para o lúmen do retículo endoplasmático, onde a unidade catalítica da G6Pase está situada. Em ambas, a deficiência enzimática é o resultado de mutações genéticas nos genes que codificam estas enzimas, conhecidos respectivamente como *G6PC* e *G6PT1*.

O diagnóstico bioquímico é recomendável caso se queira desvendar e recomendar modalidades de tratamento, porém não fornece informação suficiente para a determinação do subtipo envolvido. Para essa diferenciação é necessário análise enzimática da G6Pase. Como essa enzima não é expressa em tecidos como fibroblastos ou linfócitos, sua aferição só é possível por procedimento cirúrgico, através de biópsia hepática. Nesse contexto, a clonagem do cDNA do *G6PC* e *G6PT1* possibilitou o rastreamento de mutações responsáveis pelos subtipos Ia e Ib, o que permite a alternativa de um diagnóstico menos invasivo baseado em técnicas de biologia molecular através de amostras de sangue.

No presente estudo, treze pacientes com sintomas clínicos sugestivos de GSDIa e Ib foram investigados através do sequenciamento genético.

Foram detectadas para o gene *G6PC* cinco alterações, incluindo, três mutações de ponto (G68R, R83C e Q347X) e dois polimorfismos (c.511G>A e c.1176T>C), todos previamente descritos. Já para o gene *G6PT1* foram encontradas quatro alterações: uma mutação de ponto conhecida (G149E), uma inserção do tipo *frameshift* inédita na literatura especializada (c.1338_1339insT) e dois polimorfismos (c.1287G>A e c.1076-28C>T).

A frequência das mutações em nosso meio é semelhante à observada na literatura, na qual a mutação R83C também é a mais frequente. Além disso, o presente estudo acrescentou a descrição de uma nova mutação.

A pesquisa de ambos os genes deve ser considerado na investigação dessa condição para definir os subtipos envolvidos, pois no caso de ausência de alterações no gene *G6PC*, sugere-se o rastreamento no gene *G6PT1*.

O estudo molecular dessa condição abre a possibilidade do diagnóstico precoce que é importante para estabelecer um tratamento correto aos pacientes, evitando o surgimento de complicações tardias e melhorando a qualidade de vida. Além disso, contribui para o aconselhamento genético adequado do casal podendo confirmar a estimativa do risco entre os próximos filhos e, eventualmente, permitir diagnóstico pré-natal por análise de mutação.

ABSTRACT

Glucose transformation into glycogen is mediated by specific enzymes and a deficiency in one of them may cause glycogen accumulation, resulting in hereditary disorders known as glycogen storage diseases (GSD), or glycogenosis. Glycogenosis type I (GSDI), responsible for more than 90% of cases, is caused by deficiency of the glucose-6-phosphatase (G6Pase), the key enzyme in blood glucose homeostasis. Its enzyme complex consists of two subunits (catalytic and transporter) that determine subtypes Ia and Ib.

GSDIa, also known as von Gierke disease, is the most common GSDI responsible for 80 to 90% of cases and corresponds to a deficiency in the catalytic subunit of G6Pase. GSDIb is the second most prevalent but also the most severe, resulting from deficiency of glucose-6-phosphate translocase that transports glucose-6-phosphate into the lumen of the endoplasmic reticulum, where the catalytic unit of G6Pase is located. In both types, enzymatic deficiency results from genetic mutations in the genes that codify these enzymes, known as *G6PC* and *G6PT1*.

Biochemical assay for GSDI is useful to confirm the diagnosis and to recommend treatment, however it does not allow the determination of the disease subtype. For this differentiation, enzymatic analysis of G6Pase is necessary. Since this enzyme is not expressed in tissues such as fibroblasts or lymphocytes, activity determination is only possible by liver biopsy. In this context, the cDNA cloning of *G6PC* and *G6PT1* allowed the screening of mutations responsible for subtypes Ia and Ib, which gives the alternative of a less invasive diagnosis based on molecular biology techniques, using blood samples.

In this study, thirteen patients with clinical symptoms suggestive of GSDIa and Ib were investigated through genetic sequencing.

Five changes were detected in *G6PC*, including three known point mutations (G68R, R83C and Q347X) and two polymorphisms (c.511G>A and c.1176T>C). Concerning the *G6PT1* gene, four changes were found: a known point mutation (G149E), a novel frameshift insertion (c.1338_1339insT) and two polymorphisms (c.1287G>A and c.1076-28C>T).

The frequency of mutations in this population is similar to that observed in the literature, in which R83C is also the most frequent. Additionally, this study added a description of a new mutation.

As result of this study, molecular analysis of both genes should be considered in the investigation of individuals with this GSDI in order to define the subtypes involved. Molecular analysis of *G6PC* and *G6PT1* genes enable the achievement of positive diagnosis of GSDIa and Ib, securely without the need for liver biopsy. It also allows the differentiation of types and subtypes, which is not possible by the biochemical diagnosis. Finally, the identification of the mutation provides an additional tool for the genetic counseling (and eventually prenatal diagnosis) of the parents and other family members

1 – INTRODUÇÃO

1.1 ERROS INATOS DO METABOLISMO

Os erros inatos do metabolismo (EIM) são distúrbios geneticamente determinados, causados pela falta da atividade de uma ou mais enzimas específicas, capazes de modificar a função de uma via metabólica conhecida do organismo. Dessa forma, tem como consequência o acúmulo do substrato da enzima deficiente, a ausência do produto da reação ou o desvio do substrato para uma rota metabólica alternativa¹, como mostra a figura 1.

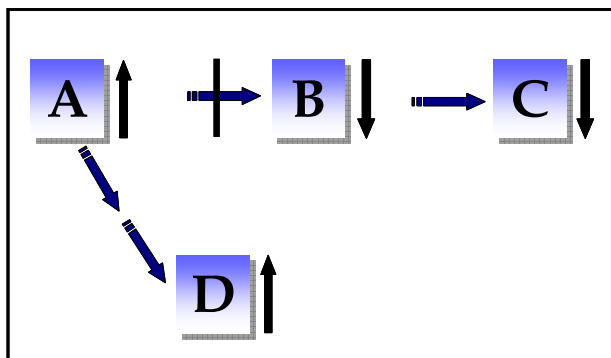


Figura 1: Via metabólica hipotética mostrando os fatores que podem levar ao comprometimento dos processos celulares. **(A)** Acúmulo de substâncias normalmente presentes em pequena quantidade; **(B)** deficiência de produtos intermediários críticos; **(C)** a deficiência de produtos finais específicos; **(D)** o excesso nocivo de produtos de vias metabólicas acessórias (Modificado de WABER, 1990)².

Tratando-se de doenças que, em geral tem herança autossômica recessiva, sua incidência isolada é rara. Todavia, se forem contabilizados os dados em conjunto de todos os EIM conhecidos, a frequência se torna mais expressiva, podendo chegar em 1:1000^{3,4,5}.

A incidência de cada EIM não foi totalmente estabelecida, devido ao diagnóstico ser subestimado. Esta falha decorre de vários fatores, entre eles o fato de serem considerados raros individualmente, o desconhecimento por muitos médicos, a demora no diagnóstico frente às causas mais comuns e a escassez de recursos para o diagnóstico laboratorial⁶.

Os EIM podem se manifestar em qualquer época e atingir qualquer sistema orgânico. Há formas leves e intensas em praticamente todos os distúrbios. Muitos pacientes não se enquadram no fenótipo clássico⁷, fato que leva os indivíduos afetados a procurarem profissionais de quase todas as especialidades médicas. Entretanto, em muitas doenças, a sobrevida do paciente pode ser normal, desde que haja acompanhamento de médicos especializados e que o indivíduo respeite os limites impostos pela própria doença.

Na literatura existem diferentes formas de classificação para os EIM e, nesse trabalho, será apresentada a mais utilizada que é a de Saudubray e Charpentier (1995)⁶ que, de acordo com o fenótipo clínico, dividiram os erros inatos em três grupos: I) defeito de síntese ou catabolismo de moléculas complexas; II) defeito no metabolismo intermediário; III) deficiência na produção e utilização de energia. Deve-se notar a complexidade envolvida no diagnóstico e seguimento desses grupos heterogêneos, pois cada defeito enzimático associa-se a características únicas e peculiares.

O grupo III, em sua maioria, é proveniente de distúrbios nos músculos estriado e miocárdio, no cérebro e no fígado. São doenças de apresentação precoce, com sinais clínicos importantes manifestando-se desde os primeiros dias de vida da criança. Os sinais clínicos mais comumente observados são: quadro agudo (encefalopatia aguda), descompensação metabólica rápida, hipoglicemia, miopatia, hipotonia generalizada, insuficiência cardíaca, retardo de crescimento e até morte súbita, entre outros sintomas⁸.

Neste grupo, foram identificadas várias doenças que resultam de algum defeito metabólico na síntese ou catabolismo de glicogênio. A categoria mais estudada e importante inclui as doenças de depósito de glicogênio ou glicogenoses (GSDs).

1.2 GLICOGENOSES

As diferentes GSDs formam um grupo de distúrbios hereditários com padrão de herança autossômico recessivo, em sua maioria, à exceção do tipo IX que é ligado ao cromossomo X. Em comum resultam em anormalidade da concentração e/ou da estrutura do glicogênio em qualquer tecido, decorrentes de erro metabólico devido a uma deficiência no sistema enzimático^{9,10}. A grande importância de uma deficiência enzimática específica é melhor compreendida a partir da perspectiva do metabolismo normal da glicose.

A molécula de glicose possui um papel central no metabolismo e tem sido altamente conservada no decorrer da evolução dos seres vivos permanecendo como combustível universal¹¹. Através da sua quebra acontece a liberação de energia necessária para o funcionamento fisiológico adequado^{12,13}, fenômeno que permite que as células que dependem da circulação sanguínea, a fim de suprir suas necessidades, utilizem essa energia¹³.

Para se ter uma idéia da importância da glicose, as células especializadas como os eritrócitos, o cristalino, a córnea e regiões da retina não possuem mitocôndria e por isso, são dependentes de glicose como principal mecanismo para a produção de ATP¹⁴.

A capacidade de sintetizar esse carboidrato é crucial para a sobrevivência dos seres humanos e outros animais¹⁵. Desse modo, o organismo humano deve promover mecanismos sincronizados e complexos para permitir que os níveis glicêmicos mantenham-se em estreitas faixas de normalidade¹⁶.

O equilíbrio entre produção e utilização de glicose nas crianças de pouca idade e nos recém-nascidos é extremamente delicado, visto que nestes a produção é duas a três vezes maior do que a do adulto, ao mesmo tempo em que o cérebro consome até seis vezes mais glicose, sempre em relação ao peso corpóreo¹⁷.

O cérebro necessita de um suprimento contínuo de glicose, particularmente no primeiro ano de vida, além de possuir um armazenamento reduzido e não a sintetizar, sendo extremamente vulnerável à hipoglicemia. Corpos cetônicos podem ser utilizados como substratos alternativos, mas a sua adaptação não é completa, o que o torna dependente da glicose¹⁶.

Após a absorção pelas células, a glicose pode ser usada imediatamente ou armazenada sob a forma de glicogênio¹³. O glicogênio é uma forma de armazenamento de glicose, que é estocado na maioria das células para dar uma fonte imediata de energia durante o estado de jejum¹⁸.

Com o aumento dos níveis circulantes de glicose após as refeições, a insulina é secretada para regular a manutenção e a homeostase de glicose em vários níveis, reduzindo a produção hepática e aumentando a captação periférica, principalmente nos tecidos muscular e adiposo¹⁹.

A maioria das células do corpo armazena quantidades pequenas de glicogênio, mas os principais depósitos desse grande polímero são encontrados no fígado e nos músculos, embora suas funções sejam diferentes em cada órgão¹⁸.

O fígado estoca glicogênio não para seu próprio uso, mas para um suprimento rápido de glicose ao sangue, especialmente para beneficiar o cérebro²⁰. Em contraposição, nos músculos esqueléticos ele é usado como combustível local quando o suprimento de oxigênio ou de glicose cai¹⁸.

A síntese de glicogênio ocorre sempre em condições de excesso de glicose e acontece através de reações químicas realizadas por enzimas específicas^{13,21}.

A via se inicia com a conversão da glicose em glicose-6-fosfato através de uma reação catalisada pela enzima glicocinase. Em seguida, pela ação da fosfoglicomutase, ela é transformada em glicose-1-fosfato, que por sua vez é convertida em uridina-difosfoglicose

(UDPG). A UDPG fornece unidades glicosil que são incorporadas através de uma ligação 1,4 para a molécula de glicogênio através da enzima ramificadora amilo-1,4-1,6-transglicosidase. A enzima fosforilase e amilo-1,6-glicosidase são as responsáveis pela degradação do glicogênio. A fosforilase retira moléculas de G-1-P das partes laterais do glicogênio, rompendo as ligações 1,4. Já a amilo-1,6-glicosidase hidrolisa as ligações 1,6. A glicose somente é liberada do fígado quando a enzima glicose-6-fosfatase (G-6Pase) catalizar a reação^{22,23,24}. No total há pelo menos oito enzimas envolvidas²⁵ e a deficiência de qualquer uma leva ao acúmulo de glicogênio¹⁸.

A primeira descrição de um defeito na mobilização de glicogênio ocorreu em 1928 por Snappes & van Creveld²⁶. Com a descoberta dos detalhes das vias do metabolismo do glicogênio, citadas acima, tornou-se possível a classificação bioquímica dessas condições²⁷.

Atualmente estão descritos 12 diferentes tipos de GSDs, apresentando como diferença a idade do surgimento do sintoma, órgão afetado, defeito enzimático específico e gravidade clínica^{28,29,30,31}. Assim, ao se nomear uma determinada GSD é preciso descrever a que defeito enzimático e a que órgãos comprometidos estamos nos referindo.

A tabela 1 relaciona as glicogenoses, baseada no defeito enzimático, levando em consideração os tecidos afetados.

A frequência total de todas as formas de doença de depósito de glicogênio, baseada em dados Europeus, é de aproximadamente 1: 120.000 a 25.000 nascimentos. Os tipos mais comuns, responsáveis por mais de 90% dos casos são: I, II, III e VI^{22,32}.

Tabela 1: Classificação das glicogenoses (segundo Diament¹² e Calçado²⁵, modificado).

Tipo	Nome alternativo	Enzima envolvida	Tecidos afetados
0	Glicogenose A	Glicogênio sintetase	Fígado e músculos
Ia	D. von gierke	Glicose-6-fosfatase	Fígado, músculos e intestino
Ib		Translocase I	Fígado, músculos e intestino
Ic		Translocase II	Fígado, músculos e intestino
Id		Translocase III	Fígado, músculos e intestino
II	D. Pompe	Glicosidase lisossômica	Coração, músculos e intestino
III	D. Cori	Amilo 1,6-glicosidase	Fígado e músculos
IV	D. Andersen	Amilo 1, 4-1, 6-glicosidase	Fígado
V	D. McArdle	Fosforilase muscular	Músculos
VI	D. Hers	Fosforilase muscular	Fígado
VII	D. Tarui	Fosfofrutoquinase	Músculos
VIII		Fosforilase hepática inativada	Fígado e cérebro
IX		Fosfoglicomutase	Fígado e músculos
X	D. Lewis	Fosfo-hexose-isomerase	Fígado e músculos
XI		Glicogênio-sintetase	Fígado e rins

Legenda: D = doença de.

1.3 GLICOGENOSE DO TIPO I

A primeira descrição desse tipo de GSD, inicialmente relatada como hepatomegalia glicogênica, ocorreu no ano de 1929 pelo patologista alemão Edgar Otto Conrad von Gierke, que evidenciou nos tecidos de autópsia de dois pacientes uma hepatomegalia e a relacionou com hipoglicemia entre as refeições³³.

O grande marco inicial indicando que os distúrbios metabólicos poderiam surgir de deficiências enzimáticas ocorreu em 1952. Os estudos de Cori & Cori demonstraram que a ausência da enzima G6Pase era o defeito enzimático responsável pela glicogenose tipo I (GSDI), estabelecendo o início da classificação das GSDs pelos tipos de defeitos enzimáticos e o envolvimento dos órgãos primários³⁴.

A histopatologia (figura 2) do fígado dos pacientes portadores de GSDI caracteriza-se por uma distensão dos hepatócitos pelo acúmulo de glicogênio e de lipídeos. A distribuição do glicogênio é uniforme, exceto nas porções onde é interrompida por vacúolos abundantes, grandes, com coloração clara e membrana plasmática proeminente. O aumento dos hepatócitos e o colapso dos sinusóides proporcionam ao parênquima uma aparência de mosaico, por obscurecer a arquitetura da placa limitante. O núcleo se encontra muito aumentado caracterizando uma hiperglicogenação. A presença de glicogênio no núcleo das células é observada em pessoas normais, mas nos portadores de GSDI o núcleo é grosseiramente aumentado, caracterizando a hiperglicogenose nuclear^{35,36,37}. Descrita em graus variados, a presença de fibrose pode acontecer e progredir com a idade^{35,36}.

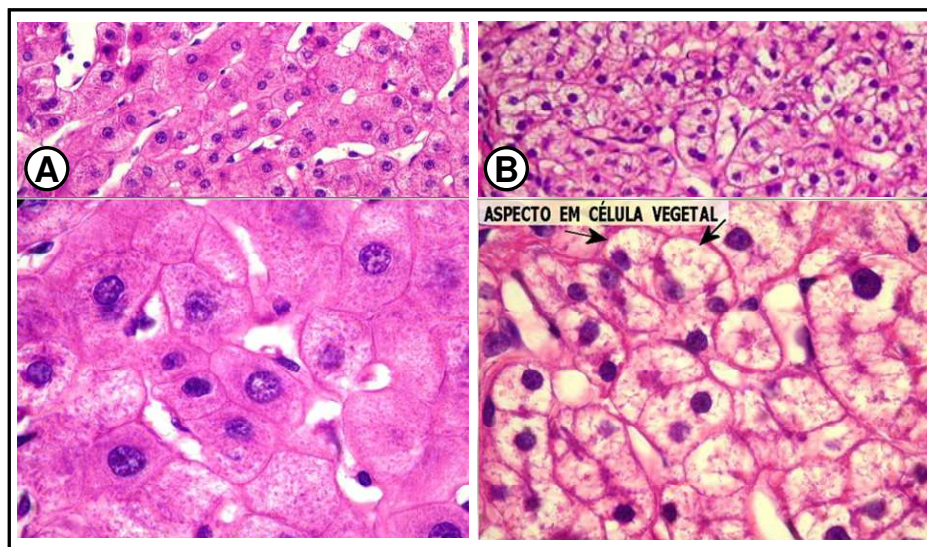


Figura 2: Hepatócitos normais *versus* anormais (glicogenose). Lâmina histopatológica de fígado, obtido por biópsia em cunha, corados por hematoxilina e eosina. O glicogênio, sendo hidrossolúvel, dissolveu-se no fixador, que é aquoso. Temos, portanto, a imagem após a retirada do glicogênio. **(A)** Hepatócitos com citoplasma bem distribuído não apresentando vacúolos (normais). **(B)** Intenso acúmulo de glicogênio nos hepatócitos, que ficam com citoplasma claro e vacuolado (aspecto em célula vegetal). Os filamentos róseos, que contrastam com o aspecto vazio do citoplasma, correspondem a organelas, como mitocôndrias e retículo endoplasmático (Modificado de <http://anatpat.unicamp.br>, reproduzido sob permissão)³⁸.

A GSDI é causada por deficiência da enzima G6Pase³⁹. Considerada enzima chave na homeostase da glicose sanguínea, catalisa o último passo de ambos os processos glicogenólise e gliconeogênese que, ao hidrolisar a glicose 6-fosfato, permite que o fígado libere glicose para alcançar outros tecidos¹¹. Os indivíduos portadores desta deficiência são incapazes de converter a glicose-6-fosfato em glicose livre para a circulação sanguínea, desse modo, outras vias metabólicas dependentes dessa etapa como de outras hexoses (frutose e galactose) também não fornecerão a glicose⁴⁰.

A G6Pase é uma enzima associada ao retículo endoplasmático (RE), constituída por uma subunidade catalítica com o centro ativo na superfície luminal do retículo e por transportadores que permitem a entrada do substrato e a saída dos produtos da reação, o que faz dela um sistema complexo e multiproteico⁴¹. Através de análises histoquímicas, sua atividade foi medida *in situ*, sendo encontrada principalmente no fígado e nos rins e em menor quantidade na mucosa intestinal e no pâncreas⁴².

As proteínas transportadoras (translocases) que fazem parte do complexo enzimático G6Pase possuem as seguintes funções: T1 (G6PT), responsável pela entrada da glicose-6-fosfato (G-6-P) através da membrana do RE; T2, pela saída do fosfato liberado pela degradação da G-6-P; e T3, transporta a glicose liberada pela hidrólise para fora do RE⁴³ (Figura 3).

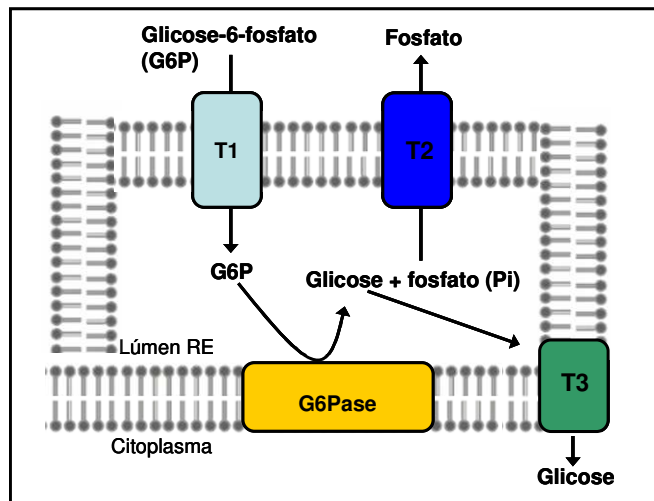


Figura 3: Modelo do complexo enzimático da G6Pase. **T1:** glicose-6-fosfato translocase; **T2:** proteína transportadora de fosfato; **T3:** proteína transportadora de glicose.

A estrutura secundária da enzima G6Pase contém nove domínios transmembrana, com a região N-terminal localizada no lúmen do RE e a região C-terminal no citoplasma. A proteína apresenta três sítios potenciais de glicosilação ($N^{96}TS$, $N^{203}AS$ e $N^{276}SS$)⁴⁴. A localização dos aminoácidos R83, H119 e H176 determina que o sítio ativo da enzima se encerre na face luminal. Dessa forma, são cruciais para a ligação da glicose-6-fosfato ao sítio ativo da enzima e sua posterior hidrólise em glicose e fosfato⁴¹ (Figura 4).

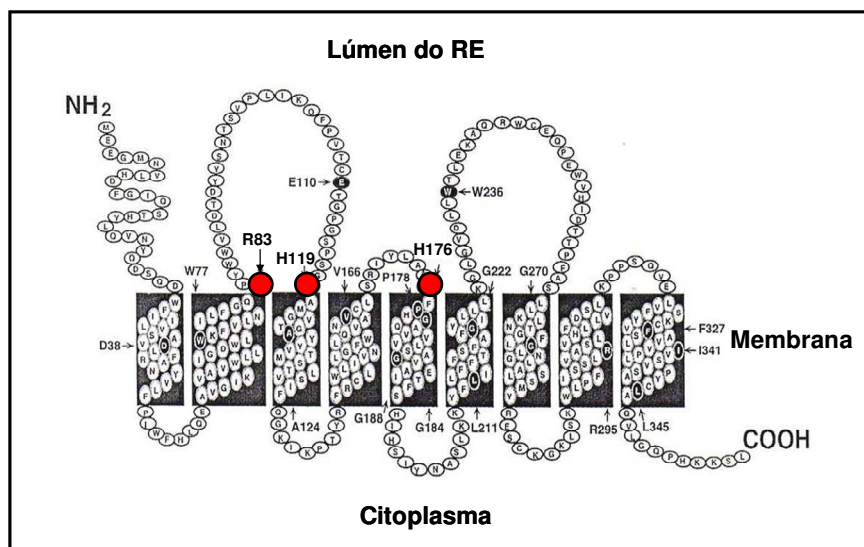


Figura 4: Estrutura proteica da G6Pase exibindo a sequência de aminoácidos e algumas mutações na face luminal e na região transmembrana. Os aminoácidos que contribuem para o sítio ativo da enzima estão destacados: R83, H119 e H176 (modificado de PAN *et al.*, 1998)

45

De acordo com Rake *et al.* (2000), já foram encontradas mutações que resultaram em troca de aminoácido em um dos domínios transmembrânicos N-terminal e nos *loops* voltados para o lúmen do RE. Pelo fato de não terem sido encontradas alterações nos *loops* citoplasmáticos, podemos supor que esta é uma região que compromete menos a atividade catalítica da enzima⁴⁶.

Desde o início da caracterização da GSDI, vários subtipos foram sendo propostos de acordo com defeitos específicos no complexo enzimático da G6Pase.

O tipo Ia (doença de von Gierke), a mais comum, corresponde a um defeito na subunidade catalítica da G6Pase. Os tipos Ib, Ic e Id são decorrentes a deficiências de glicose 6-fosfato translocase (T1)⁴⁷, transporte microssomal de fosfato (T2)⁴⁸ e transporte microssomal da glicose (T3)¹⁰, respectivamente.

Existe na literatura uma discussão em torno da classificação dos subtipos Ib, Ic e Id. Os genes para GSDIb e GSDIc foram localizados no mesmo local por estudos independentes. Este fato levou outros autores a duvidarem da possibilidade da existência de transportadores diferentes para a glicose-6-fosfato e fosfato⁴⁹ e a defenderem que, na prática, só existem dois tipos de GSDI que podem ser diferenciadas por meio da análise da atividade enzimática da G6Pase e por análise de mutações nos genes da glicose 6-fosfato (*G6PC*) e da glicose 6-fosfato translocase (*G6PT1*), sendo eles o Ia e o Ib. Acredita-se que os doentes anteriormente diagnosticados com GSDIc são, na realidade, possuidores de GSDIb⁵⁰. Do mesmo modo, não há evidências genéticas que permitam considerar a existência da GSDId, que seria causada por deficiência na saída da glicose do RE. O mecanismo de transporte da glicose na membrana do RE é ainda desconhecido⁴⁷.

1.4 GLICOGENOSE DO TIPO IA (DOENÇA DE VON GIERKE)

A doença de von Gierke é a mais comum das GSDI totalizando 80 a 90% dos casos e possui uma frequência estimada de 1: 100.000 nascimentos⁵¹. Em populações de Judeus Ashkenazi, o acometimento dessa condição pode ser muito mais alto, tendo uma frequência estimada de portadores na população de 1: 65 indivíduos⁵². A doença de von Gierke acomete

em igual frequência pessoas do sexo masculino e feminino e já foi descrita em hispânicos, caucasianos, japoneses, chineses, judeus e turcos⁵³.

Como mencionado anteriormente, é causada por um defeito na subunidade catalítica do complexo enzimático da G6Pase³⁴, defeito este causado por mutações genéticas no gene que codifica esta enzima, conhecido como *G6PC*⁴⁴.

O gene *G6PC* foi mapeado no cromossomo 17, *locus* q21, possui um transcrito de 12,5Kb e é dividido em cinco *exons* com 230, 110, 106, 116 e 512 pares de bases, respectivamente⁴⁴ (figura 5). Sua expressão é restrita ao fígado, aos rim e ao intestino⁵⁴.

Já foram descritas até o momento, 86 tipos diferentes de mutações neste gene que afetam a atividade da G6Pase, incluindo mutações do tipo: *missense e nonsense*^{39,44,46,53, 55-77}, pequenas deleções e inserções^{39,46,56,57,60,65,66,70,72,78-80} e alterações em sítios de *splicing*^{60,69,78,81,82}.

As mutações mais frequentes na população norte americana são a R83C e a Q347X, representando 70% dos alelos nos pacientes caucasianos⁴⁴ além da 130X e da R83C em hispânicos e a R83H em chineses⁸³.

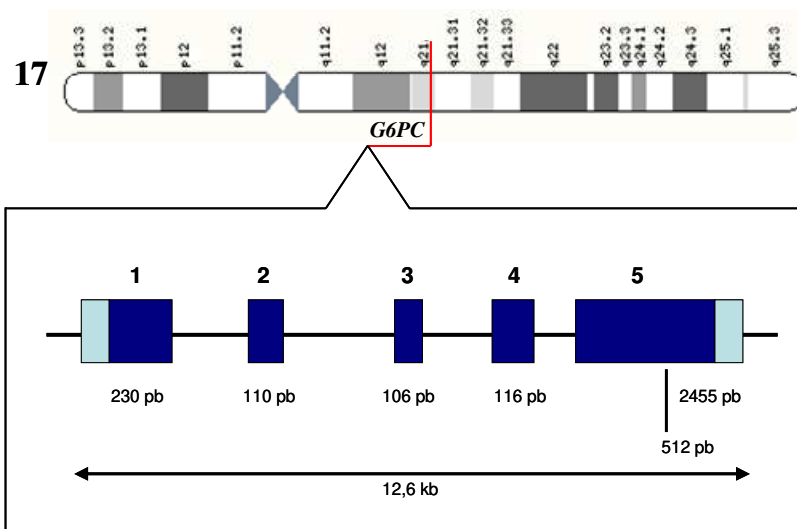


Figura 5: Representação da estrutura do gene *G6PC* e sua localização no cromossomo 17. (Ideograma do cromossomo, modificado de: *The Ensembl Project Database*)⁸⁴.

O quadro clínico dos pacientes com glicogenose tipo Ia é inerente às alterações fisiopatológicas.

A idade média para ocorrerem os sinais e sintomas é de aproximadamente seis meses, sendo que 90% dos pacientes apresentam alguma manifestação antes de completar um ano de vida⁸⁵.

A clínica, que alia a história da doença ao exame físico, de fato contribui para um diagnóstico preciso através da identificação de sinais característicos, podendo conduzir para realização de outros exames confirmatórios mais adequados e para uma terapêutica precoce³.

As principais manifestações clínicas são caracterizadas por abdômen protuberante, palidez, sudorese e sintomas de hipoglicemia após poucas horas de jejum^{86,87}.

No exame físico há certo grau de obesidade no tronco, atraso no crescimento, hepatomegalia e depósito de gordura localizado nas bochechas, conhecido como “face de boneca”⁸⁸. Esta última é considerada característica da doença^{23,86,87}.

As características laboratoriais frequentemente vistas por pacientes portadores de GSDIa são hipoglicemia, acidose láctica, hiperuricemia e hiperlipidemia⁸⁹. A fisiopatologia dessas alterações é ilustrada na figura 6.

A hipoglicemia é consequência da diminuição da insulina e aumento do glucagon, e pode não ser acompanhada de sintomas, devido à utilização do ácido láctico como substrato para o metabolismo cerebral. Em razão disso, torna-se pouco provável que os pacientes tenham lesão cerebral nesses episódios⁸⁹.

A acidose láctica, por sua vez, é decorrente da não utilização do ácido láctico durante a gliconeogênese, o que torna os níveis do mesmo aumentado em cerca de quatro vezes em relação aos valores normais⁸⁹.

Com a diminuição da depuração renal de urato e o aumento da produção de ácido úrico no sangue surge a hiperuricemia^{20,91}, que pode levar a complicações em 14% dos

pacientes⁸⁵. As consequências encontradas nesse tipo de alteração são os cálculos renais, a gota e a nefropatia.

Outra consequência metabólica importante é a hiperlipidemia, que se dá devido ao aumento dos produtos glicolíticos como o NADP, NADH, fosfato, glicerol-3-fosfato e coenzima A, essenciais para a síntese de colesterol e ácidos graxos²⁰.

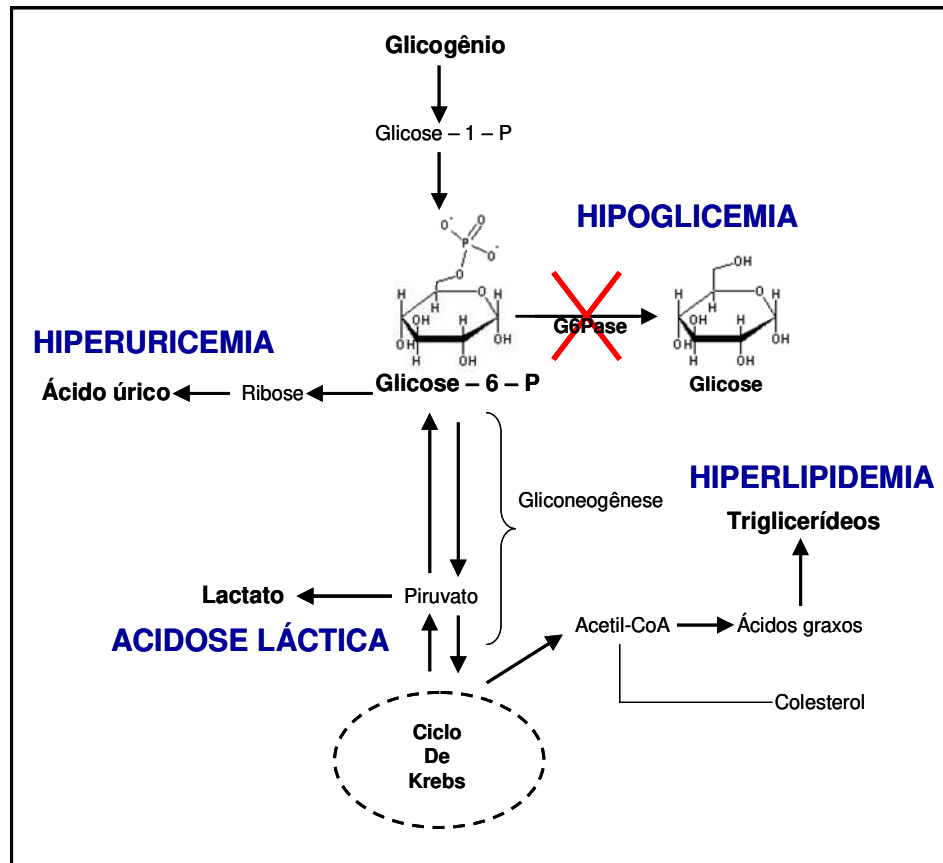


Figura 6: Consequências metabólicas provocadas pela glicogenose tipo I. A deficiência na atividade da G6Pase interrompe a constante reciclagem de glicose no fígado, causando **hipoglicemia**. O acúmulo de glicose-6-fosfato no meio intercelular leva a um aumento da reação glicolítica, com produção de piruvato, convertido em lactato, determinando **acidose láctica**. A **hiperuricemia** e a **hiperlipidemia** são respectivamente causados pelo aumento na produção de ácido úrico e aumento da síntese de triglicerídeos, VLDL e LDL. Modificado/adaptado de CHEN, 2001⁹⁰.

Como a glicose-6-fosfato não pode ser convertida em glicose e o fosfato não é liberado da molécula, ocorre depleção de fosfato intracelular, o que resulta em hipofosfatemia, já que ocorre um desvio compensatório do fósforo extracelular para o interior da célula⁹².

Com o aumento da reação glicolítica, há uma produção abundante de acetil-CoA e glicerol, que são substratos para a produção de triglicérides e colesterol, resultando em aumento da lipogênese. Observa-se ainda, altos níveis séricos de ácidos graxos livres, provavelmente consequentes à lipólise do tecido adiposo regulada pela atividade da lipase⁹³, lipoproteína com atividade diminuída nesse tipo de GSD⁹⁴.

Nas crianças maiores podem ser encontrados xantomas devido à dislipidemia⁹⁵. Complicações relativas à dislipidemia não são frequentes, mas colelitíase e pancreatites podem ocorrer⁹⁵.

A deposição de cristais de monourato de sódio nos tecidos orgânicos, conhecida como doença gotosa, pode ser observada na puberdade⁹⁶.

A presença de microalbuminúria e dislipidemia, marcas quase constantes da GSDIa, pode ocasionar aterosclerose⁹⁷, entretanto, esta complicação não é vista com frequência nesses pacientes⁹⁸. A osteoporose associada a fraturas e o atraso de idade óssea também podem ser vistos, uma vez que há acidemia persistente e balanço negativo de cálcio⁸⁷.

O transporte de oxigênio dos pulmões para os tecidos é comprometido, estando associado a um controle metabólico pobre. Um estudo observou 20% de anemia⁸⁵. Essa condição resistente à terapia com ferro foi relacionada à presença de adenomas hepáticos⁹⁹, uma complicação frequente nesse tipo de GSD^{100,101}. A utilização de hormônios hepatotrópicos para estimulação do fígado no combate a hipoglicemia também pode ser responsável pelo seu surgimento¹⁰².

Um problema importante são as complicações renais encontradas com grande frequência. Hiperfiltração geralmente é a primeira manifestação de doença renal^{28,103} e nefromegalia é muito comum^{90,104}. Aos 16 anos de idade, os pacientes apresentam microalbuminúria e proteinúria em uma porcentagem de 40% e 8%, já aos 24 anos cerca de 80% e 20%, respectivamente⁸⁵. Hipocitratúria foi observada em 100% dos pacientes em dois estudos^{92,105}. A hipertensão arterial foi observada em 6% dos pacientes com idade mediana de 17 anos⁸⁵.

A partir da segunda e terceira décadas de vida, em cerca de 50 a 70% dos afetados, surgem os adenomas hepáticos, o que pode resultar em transformação maligna e hemorragia aguda^{106,107}.

Apesar de vários pesquisadores relatarem transformações malignas em seus estudos^{108,109,110}, a patogênese da doença ainda permanece obscura. Hipóteses sugerem sobrecarga de glicogênio celular, desequilíbrio da relação glucagon-insulina e ativação de *proto-oncogenes*¹¹¹. Outro fato que poderia ser explicado estaria relacionado com as alterações no metabolismo lipídico, uma vez que na GSDI há uma maior liberação de ácidos graxos livres pelo tecido adiposo. É possível especular que pelo menos alguns desses ácidos graxos que chegam ao fígado possam ser oxidados, levando a produção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂), que pode estar envolvido na origem de mutações no DNA e na gênese dos tumores¹⁰⁵.

Outras características como hematomas associados a períodos de sangramento, devido ao decréscimo da agregação e adesão plaquetárias, diarreia intermitente¹⁰, lesão cerebral conseqüente à hipoglicemia crônica grave¹¹², hipertensão pulmonar grave secundária a altos níveis de serotonina¹¹³, irritabilidade, tremores, apnéia, hiperventilação, cianose, coma e até mesmo a morte⁸⁵ foram observadas em alguns pacientes. Nos adultos, a glicose pode atingir níveis inferiores a 2,8 mmol/L (50mg/dL), após jejum noturno¹⁰³.

1.5 GLICOGENOSE DO TIPO IB

A glicogenose tipo Ib é a segunda forma mais prevalente e mais grave das GSDI¹⁰. Conforme mencionado antes, é resultante da deficiência da glicose-6-fosfato translocase uma proteína T1 que transporta a glicose-6-fosfato para o lúmen do retículo endoplasmático, onde a unidade catalítica da G6Pase está situada⁴⁷.

O gene *G6PT1* que codifica a enzima glicose-6-fosfato translocase foi clonado por GERIN e colaboradores em 1997¹¹⁴ e está localizado no cromossomo 11, *locus* 11q23 e possui 11 *exons* distribuídos em aproximadamente 5,0 Kb¹¹⁵ (Figura 7). Já se sabe que o *exon* 7 não é expresso no fígado e no rim, e sim no coração e no cérebro e possui um *splicing* alternativo¹¹⁶. De acordo com PAN e colaboradores (1999), a estrutura secundária da enzima possui 10 domínios transmembrânicos, com as regiões N-terminal e C-terminal localizadas no citoplasma¹¹⁷.

Várias mutações também já foram descritas neste gene, incluindo: deleções^{49,118-124}, inserções^{49,121,123}, alterações de *splicing*^{49,119,120,124,125,127}, *missense e nonsense*^{49,114,118-128}. Algumas mutações são mais frequentes, como: Gly339Cys e 1211-1212delCT⁴⁹.

As GSDs tipo Ia e Ib são clinicamente muito similares, exceto por alguns sinais característicos. Os portadores de Ib apresentam neutropenia e piora da função dos neutrófilos resultando em infecções piogênicas recorrentes, gengivoestomatite e doença inflamatória intestinal, não observadas no tipo Ia¹²⁹. Esses sintomas clínicos puderam ser explicados devido ao gene *G6PT1* ser expresso nas células progenitoras hematopoiéticas¹³⁰.

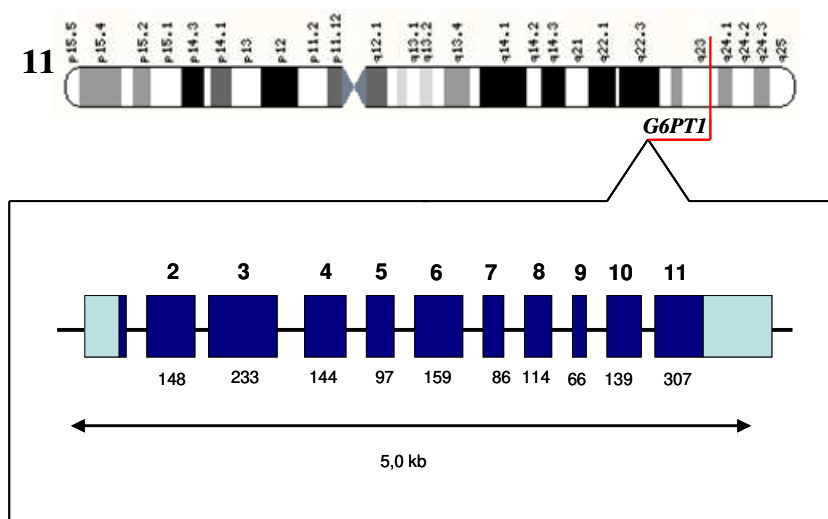


Figura 7: Representação da estrutura do gene *G6PT1* e sua localização no cromossomo 11. (Ideograma do cromossomo, modificado de: *The Ensembl Project Database*)⁸⁴.

A gengivostomatite caracteriza-se por lesões maculares iniciais, seguidas de úlceras superficiais e dolorosas à alimentação. A análise histológica dessa lesão mostra apenas um infiltrado inflamatório inespecífico¹³¹.

As infecções são causadas por estafilococos e alguns bacilos gram-negativos. Cerca de 80% são múltiplas, iniciam-se no primeiro ano de vida¹³² e os principais sítios de infecção são: ouvido (otite), perianal (abscesso e fístula), do trato urinário (ITU) e pulmão (pneumonia)¹²⁹. As infecções e a neutropenia são sintomas que podem demonstrar que mutações no gene *G6PT1* estão envolvidas não apenas com a subunidade catalítica da G6Pase, mas também podem estar relacionadas com o comprometimento de outras funções¹³³.

A neutropenia representa a quantidade anormal de neutrófilos no sangue, que são o principal sistema de defesa celular do organismo contra bactérias e fungos. Vários estudos comprovaram a baixa contagem e anormalidades da função dessas células em pacientes com esse tipo de GSD^{97,98}. A intensidade e a duração da neutropenia se correlacionam com um risco maior de desenvolver infecções^{134,135}. As alterações dos neutrófilos incluem aderência

reduzida, destruição bactericida alterada, defeitos na atividade fagocítica e redução na produção de ânion superóxido (metabólitos de oxigênio antimicrobianos)⁹⁶.

Um dos fatores cogitados como um defeito primário, para as alterações supracitadas, poderia ser a redução da disponibilidade de G-6-P para dentro da célula, uma vez que a alteração no transporte de glicose para o interior dos polimorfonucleares provavelmente acontece por uma redução da atividade dos transportadores, que pode estar associado aos danos funcionais do neutrófilo¹³⁶. Mesmo que estudos tenham demonstrado essas alterações, a patogênese ainda é um enigma a ser descoberto⁹⁷, e estudos adicionais serão necessários para comprovar uma relação entre essas células e os defeitos hepáticos conhecidos.

Também tem sido observada, nesses pacientes, uma doença inflamatória intestinal semelhante à Doença de Crohn¹³⁷ e parece estar associada a disfunção de neutrófilos presentes nesse subtipo de glicogenose^{138,139,140,141}.

Uma complicação bastante importante e relativamente comum é a periodontite, que resulta de um processo inflamatório crônico iniciado na gengiva para os tecidos de suporte dos dentes, contribuindo para a destruição do periodonto¹³². Sua associação com distúrbio dos neutrófilos, assim como acontece nesse subtipo de GSD, já foi evidenciada¹⁴².

Por fim, a idade de apresentação dos quadros clínicos citados é variável, podendo manifestar-se desde o primeiro ano de vida até aos quatro anos (com idade média aos quatro meses)⁸⁵.

1.6 DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO DOS SUBTIPOS IA e IB

Diagnosticar de maneira correta um EIM é o passo fundamental para que seja iniciado um tratamento eficaz. Quanto mais precocemente for feito o diagnóstico e instituído um tratamento, mais favorável será a evolução dos pacientes. Ainda que o prognóstico seja ruim, mesmo com tratamento, a confirmação do diagnóstico é importante para diminuir a ansiedade das famílias, para o aconselhamento genético e acompanhamento pré-natal em futuras gestações.

O diagnóstico pré-natal permite a detecção, ainda no útero, de doenças que de outra forma somente seriam diagnosticadas após o nascimento. Isso tranquiliza e reduz a ansiedade associada à gestação, principalmente naquelas situações em que o prognóstico é grave ou sem a possibilidade de um tratamento eficaz. O desenvolvimento de técnicas para diagnosticar as doenças genéticas dessa forma foi um avanço, tornando esse tipo de diagnóstico parte integrante do processo de aconselhamento genético¹⁴³.

No passado, particularmente na década de 70, os pacientes com GSD eram internados com frequência devido à hipoglicemia. O índice de mortalidade era elevado, os danos neurológicos eram inevitáveis e os sobreviventes apresentavam grande atraso no crescimento e desenvolvimento mental^{89,144}.

Após a introdução de técnicas terapêuticas eficazes, como um tratamento dietético adequado, o prognóstico tornou-se bom e os pacientes tiveram um aumento na expectativa de vida, ultrapassando a terceira década.

O diagnóstico bioquímico preciso através da biópsia hepática é recomendável, caso se queira desvendar e recomendar modalidades de tratamento. As características anátomo-patológicas do fragmento hepático são sensíveis e embora possam contribuir para o

diagnóstico da glicogenose tipo I, ele não fornece informação suficiente para a determinação do subtipo envolvido¹⁴⁵.

O método tradicional para essa diferenciação se baseia na análise enzimática da G6Pase, estudando os microsossomos hepáticos na forma intacta e rompida, com pelo menos dois substratos. Como a G6Pase não é normalmente expressa em tecidos como fibroblastos de pele ou linfócitos, este procedimento torna-se invasivo, pois requer biópsia de fígado²⁴.

Atualmente, com a identificação dos genes *G6PC* e *G6PT1*, o diagnóstico definitivo pode ser realizado através da análise de suas mutações⁶².

Baseado em vários estudos nos quais o diagnóstico definitivo dessas doenças foi realizado através da análise de suas mutações, Rake e colaboradores (2000) criaram um roteiro para investigação diagnóstica, que consiste na combinação da análise de mutações com as alterações clínicas e bioquímicas⁴⁶, como pode ser demonstrado no fluxograma da figura 8.

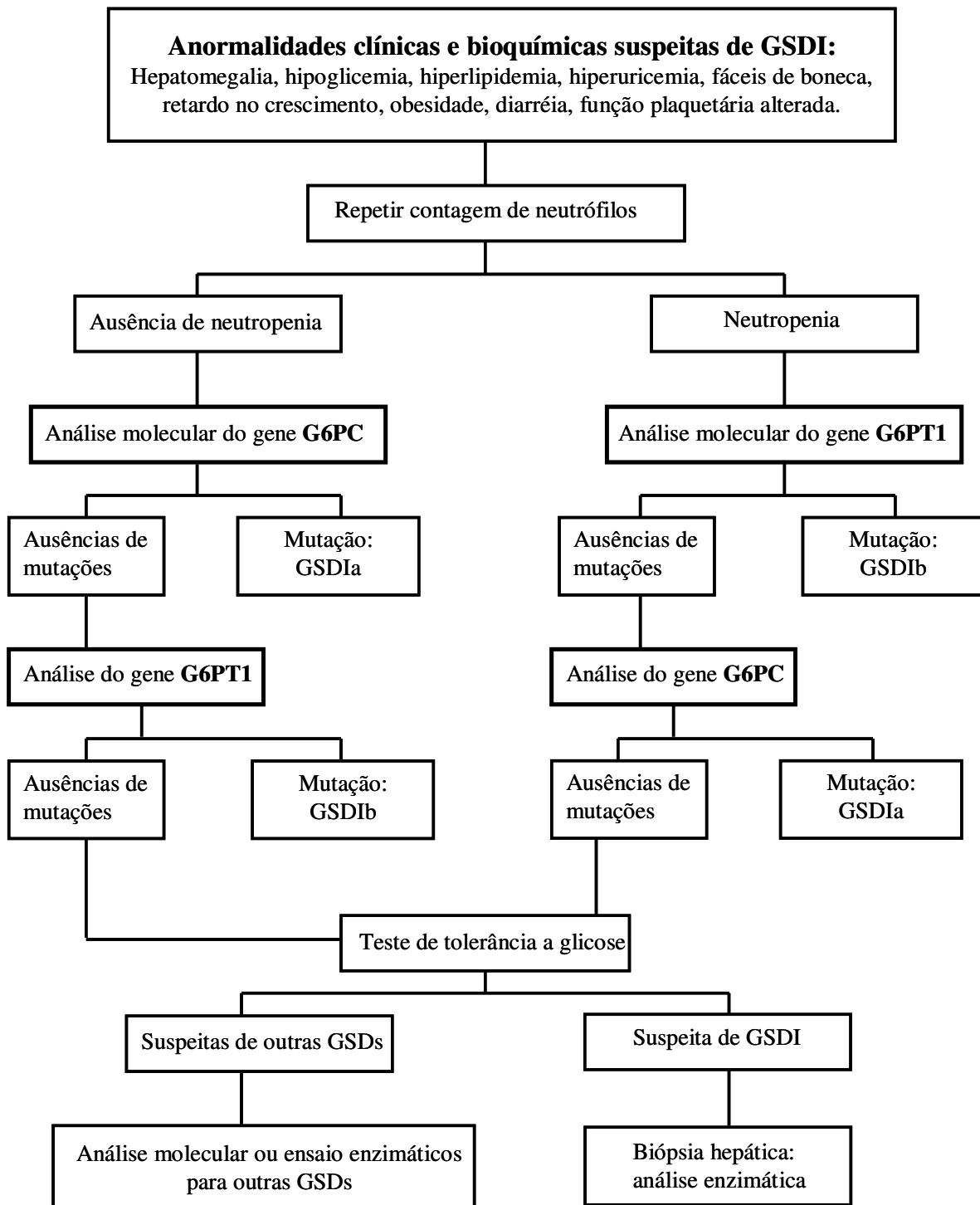


Figura 8: Fluxograma para o diagnóstico das GSD Ia e Ib. Modificado de Rake *et al.*, 2000⁴⁶.

Se o paciente não sofre de neutropenia, mutações no gene *G6PT1* devem ser as primeiras a serem excluídas. Contudo, deve-se levar em consideração que nos pacientes jovens de GSDIb, estas características específicas nem sempre são observadas, fato que o torna um sintoma não obrigatório. Quando forem encontradas pelo menos duas mutações em heterozigose, nos respectivos genes causadores de GSDIa e GSDIb, a análise da atividade enzimática em biópsia de fígado não é mais necessária para se estabelecer um diagnóstico definitivo. Porém, se não forem encontradas mutações em nenhum dos dois genes, o teste de tolerância a glicose é recomendado⁴⁶.

Não há cura para a GSD Ia e Ib. Os objetivos do tratamento visam prevenir alterações metabólicas agudas, principalmente os episódios de hipoglicemia sintomática, proporcionando dessa forma, um desenvolvimento psicomotor normal e uma boa qualidade de vida¹⁴⁶.

Um bom controle glicêmico pode retardar ou até mesmo evitar o aparecimento de complicações tardias da doença (doença renal progressiva e as complicações dos adenomas hepáticos)⁵². Um tratamento dietético adequado pode proporcionar à maioria dos doentes adultos uma vida praticamente normal e diminuir a morbidade durante a infância¹⁴⁶.

No caso da glicogenose tipo Ia a proposta é providenciar uma fonte dietética de glicose a fim de se manter a glicemia acima de 70 mg/dL e o lactato menor que 2,0 nmol/L^{52,147,148}.

Muitos métodos a fim de dispor dessa fonte de glicose foram tentados. Na primeira metade do século foi proposta a alimentação repetida com glicose para impedir a hipoglicemia de jejum, porém muitos pacientes na adolescência tinham déficit de crescimento ou nem mesmo conseguiam sobreviver⁸⁹.

O maior avanço ocorreu em 1976, quando Greene e colaboradores combinaram as vantagens do fornecimento contínuo de glicose à noite com refeições frequentes durante o dia,

ministrada sob a forma de refeições fracionadas em intervalos pequenos, com elevado teor de amido durante o período de vigília e por sonda nasogástrica durante o sono¹⁴⁹. Houve também a descoberta do uso de carboidrato cru (amido de milho), que permite a liberação dos resíduos de glicose de maneira lenta, prolongando a normoglicemia no período pós-prandial¹⁵⁰. O controle dietético satisfatório é evidenciado pela normalização do crescimento, pela ausência de anormalidades metabólicas secundárias e pelo controle da diátese hemorrágica⁹.

Na GSDIb a manutenção da glicemia é alcançada através da utilização da alimentação enteral noturna e carboidratos de absorção lenta, assim como na GSDIa, e tratamento das infecções recidivantes¹⁵¹.

A constatação de que as modificações dos neutrófilos não estariam ligadas com o controle metabólico, encorajaram os pesquisadores a descobrirem outras opções para o controle das infecções. O uso de sulfametoxazol-trimetoprim e antimicrobianos durante a infecção aguda foram as primeiras abordagens para o tratamento, mas a efetividade de ambas estratégias são limitadas¹³².

Embora o carbonato de lítio tenha mostrado um efeito positivo na produção de fator estimulante de colônia de granulócitos¹⁵², seu uso para fins profiláticos não tem sido recomendado, em razão de seus efeitos colaterais e da necessidade de monitoração frequente da concentração sérica, que tende a variar consideravelmente¹⁵³. Os fatores hematopoiéticos estimulantes de colônias de granulócitos representam uma abordagem mais promissora para o aumento da contagem de neutrófilos¹³².

Uma técnica que tende a ser promissora, e que vem obtendo bons resultados em estudos com camundongos e cachorros é a terapia gênica; na qual ocorre a transferência da versão funcional do gene, que está defeituoso ou ausente, para o organismo do paciente portador de uma enfermidade, de modo a reparar o defeito.

A eficácia desta estratégia foi comprovada por Zingone e colaboradores no ano de 2000, com a administração de um vetor adenoviral recombinante contendo o gene normal da G6Pase, em camundongos com deficiência neste mesmo gene, portadores de sintomas característicos de GSDI em humanos. A atividade hepática foi restaurada em 19%, houve uma melhora significativa no crescimento dos camundongos e as taxas de glicose plasmática, colesterol, triglicerídeos e ácido úrico foram normalizadas¹⁵⁴.

Em outro estudo, a infusão contendo o gene *G6PT1* em camundongos restaurou os níveis de expressão do mRNA no fígado, medula óssea, baço e também corrigiu as anormalidades mielóides¹⁵⁵. Portanto, com resultados significantes, é de se esperar que essa doença em humanos possa vir a ser corrigida por esse tipo de terapia.

O transplante hepático normaliza os parâmetros metabólicos, o crescimento físico e intelectual¹⁵⁶. Ele deve ser considerado quando o tratamento dietético falha, ou quando há suspeita de um adenoma hepático sofrer transformação maligna¹⁵⁷.

Para os pacientes portadores de GSDIb com doença inflamatória intestinal e infecções recorrentes, o transplante de medula óssea também foi proposto como opção de tratamento¹⁵⁸.

A elucidação dos mecanismos bioquímicos e moleculares envolvidos na doença permitiu a racionalização do tratamento e seguimento ambulatorial dos pacientes, bem como, da investigação diagnóstica. Aderência ao tratamento e precocidade no diagnóstico são fundamentais para uma boa evolução nas doenças onde o tratamento não é curativo.

Sendo a biópsia hepática um procedimento invasivo, e com riscos inerentes ao ato cirúrgico e anestésico, a realização de um diagnóstico precoce em lactente de três a cinco meses de idade, por exemplo, se torna um grande desafio. Além disso, pela limitação de laboratórios que realizam a dosagem enzimática, principalmente para pacientes do SUS, e pelas dificuldades técnicas de coleta, envio e processamento dessas amostras, o diagnóstico enzimático não está sendo realizado nesse centro. Atualmente, o único exame laboratorial que

permite a confirmação do diagnóstico clínico disponível em nosso serviço é o rastreamento de mutações responsáveis pelos subtipos Ia e Ib baseado em técnicas de biologia molecular⁶². Ainda em relação a este centro, na década de 1990 foi estabelecido protocolo de investigação molecular dessas doenças baseado em sequenciamento manual, entretanto, devido a dificuldades técnicas (demorado e baseado em utilização de radioisótopos), tais exames deixaram de ser realizados há longa data. A presente proposta é baseada em sequenciamento automático, o que permitiu contornar as dificuldades anteriormente citadas. Com isso podemos diagnosticar precoce e rapidamente pacientes, ajudando no prognóstico da doença através de amostras de sangue, pele ou em caso de teste pré-natal através de vilosidade coriônica ou cultura de líquido amniótico.

2 – OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- Rastrear mutações em *exons* e junções *exon-intron* no gene *G6PC* em indivíduos com suspeita clínica de glicogenose tipo Ia, e no gene *G6PT1* em pacientes com glicogenose tipo Ib, através da técnica do sequenciamento automático do DNA.

2.2 Objetivo Específico

- Estabelecer um protocolo para o estudo molecular das glicogenoses.
- Comparar os achados moleculares com o subtipo clínico proposto para esses indivíduos, a fim de diferenciar os tipos e subtipos de GSDs em nossa casuística de pacientes.

3 – MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ASPECTOS ÉTICOS

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp, protocolo 845/2008 (anexo 1). O presente estudo cumpriu as normas que regulamentam Pesquisas em Seres Humanos, seguindo a Resolução nº196/96, 251/97, 340/04 e 347/05 do Conselho Nacional da Saúde. Todos os pacientes ou responsáveis que concordaram em participar da pesquisa formalizaram sua anuência através de termo de consentimento livre e esclarecido (anexo 2).

Para assegurar que toda a manipulação de informação clínica e molecular seja confidencial, questionários clínicos, amostras de sangue e DNA foram identificadas por um código comum designado no momento em que o indivíduo entrou no estudo. Os resultados obtidos foram encaminhados para os clínicos responsáveis pelos pacientes.

O armazenamento da amostra de sangue para eventuais estudos foi realizado somente sob autorização, assinando um requisito específico dentro do TLCE, sendo que, para outro uso futuro, será submetido novamente à apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa da FCM/ UNICAMP, e todo indivíduo pode ter acesso a seus dados genéticos, assim como tem o direito de retirá-los do banco onde se encontrem armazenados, a qualquer momento, sem prejuízo a seu atendimento clínico.

3.2 CASUÍSTICA

Foram estudados 13 indivíduos não relacionados com quadro clínico sugestivo de glicogenose tipo Ia e Ib (tabela 2). Todos os pacientes estão em acompanhamento nos Ambulatórios de Erros Inatos do Metabolismo e de Hepatologia Pediátrica do Hospital das Clínicas da Universidade Estadual de Campinas – Unicamp.

Tabela 2: indivíduos incluídos no estudo conforme gênero, idade, tipo de glicogenose e presença de consanguinidade entre os genitores.

Indivíduo	Sexo	Idade no atendimento inicial (Unicamp, meses)	Tipo de GSD pela clínica	Consanguinidade parental
1	F	12	Ia	N
2	M	12	Ia	S
3	F	11	Ib	N
4	M	24	Ib	S
5	F	8	Ia	S
6	M	9	Ia ou Ib ?	N
7	F	48	Ia	N
8	F	36	Ia	N
9	M	104	Ia	S
10	M	12	Ia	N
11	M	48	Ia ou Ib ?	N
12	M	132	Ia ou Ib ?	N
13	M	288	Ia	N

Legenda: F = feminino; M = masculino; N = não; S = sim.

Os critérios de inclusão no estudo foram:

- Diagnóstico clínico de GSD tipo Ia ou Ib a partir de quadro clínico composto por episódios recorrentes de hipoglicemia associado a hepatomegalia, “face de boneca” e alterações bioquímicas incluindo hipoglicemia, hipertrigliceridemia, hipercolesterolemia, hiperuricemia e eventual neutropenia.

Os critérios de exclusão no estudo foram:

- Pacientes com quadro clínico sugestivo de outros tipos de GSDs ou não anuência dos pais ou responsáveis para participar do projeto.

3.3 ESTRATÉGIA UTILIZADA

Primeiramente foram amplificados cada *exon* e suas junções *exon-intron* dos genes *G6PC* e *G6PT1* através da técnica de PCR. Em seguida, foram rastreadas mutações através do sequenciamento automático. As trocas de bases encontradas nos genes foram pesquisadas em banco de dados genéticos para verificação de descrições anteriores. Quando não descrita, a alteração foi investigada em controles a fim de averiguar a possibilidade de serem polimorfismos comuns encontrados na população.

3.4 DESCRIÇÕES DOS MÉTODOS

3.4.1 Extração de DNA

A extração do DNA genômico das amostras colhidas foi realizada utilizando-se protocolos manuais de extração de DNA com fenol-clorofórmio, descritos a seguir:

Aproximadamente 30 mL de sangue venoso foram colhidos dos indivíduos recrutados para o estudo. As amostras foram centrifugadas a 1900 rpm por 10 minutos e a parte intermediária onde estão localizados os leucócitos foi transferida para um tubo de propileno com fundo cônico. Em seguida, adicionou as soluções de RSB 1X (até completar um volume de 11 mL) e 60µl de Nonidet®. A solução foi centrifugada a 2900 rpm por 10 minutos e o sobrenadante descartado. Três mL de solução SDS a 10% e 60µl de proteinase K (100mg/mL) foram adicionados e as amostras incubadas a 37°C por 24h. Após a incubação foi acrescentada 3 mL de fenol, seguido de centrifugação a 2500 rpm por 10 minutos e descarte da parte orgânica da solução. Esse processo foi repetido com 1,5 mL de fenol e 1,5 mL de uma solução de álcool isoamílico e clorofórmio (1:24), seguido de 3 mL de uma solução de álcool isoamílico e clorofórmio (1:24).

O DNA genômico foi então precipitado com 6,0 mL de etanol absoluto. Esse método propicia a extração de grande quantidade de DNA (acima de 700µg a partir de 20 mL de sangue venoso).

3.4.2 Amplificação por PCR

Para amplificação dos fragmentos de DNA através da técnica de PCR (do inglês, *polymerase chain reaction*) e sequenciamento dos genes *G6PC* e *G6PT1*, foram utilizados oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) que flanqueiam as regiões de interesse. Esses *primers* foram desenhados com o auxílio do programa *Generunner*® (Hastings Software Inc, USA), levando-se em consideração, a ausência de complementaridade entre as sequências, pois a dimerização diminui a habilidade do *primer* se anelar com a fita de DNA molde, e o tamanho entre 18 e 25 nucleotídeos, além da porcentagem semelhante de C e G.

Foram utilizados no total 28 oligonucleotídeos (14 pares de *primers*), sendo cinco para amplificação do gene *G6PC* e nove para o gene *G6PT1*. A tabela 3 mostra a localização de cada *primer* na sequência do gene, o tamanho dos produtos obtidos pela amplificação e as temperaturas de anelamento.

A reação de amplificação se deu nas seguintes condições:

- 0,35 µL de cada primer (direto e reverso) (20 pmoles/µL) (Imprint do Brasil Ltda.)
- 1,5 µL de cada dNTPs (1,25 mM);
- 0,2 µL de Taq DNA polimerase (5 U/µL) (Fermentas);
- 1,5 µL de tampão de PCR: 200 mM de Tris-HCL, pH 8,0; 500 mM de KCL;
- 1,0 µL de MgCl₂ (50 mM);
- 9,1 µL de água ultra-pura estéril;
- 1,0 µL de DNA (20 ng/µL)

Tabela 3: Sequência dos *primers* usados para amplificação de cada *exon* dos genes *G6PC* e *G6PT1*, tamanho (pb) dos fragmentos obtidos e temperaturas de anelamento (Ta).

Exon	Sequência dos <i>primers</i> (5' – 3') <i>G6PC</i>	Ta	pb
1	sense: TCT GCT GAC ATC TTC CT antisense: GCC TCT TTT CTT GCT GA	55,4	307
2	sense: GCA TTC ATT CAG TAA CCC antisense: TCC ACT CAG CTT CTG TCT	55,4	191
3	sense: CAC CTT TAC TCC ATT CTC antisense: GTG GTG TGT CAG CTA CA	50,0	209
4	sense: GCC AGG CTC CAA CAT TT antisense: GGA GAG AAA CGG AAT GG	58,8	259
5	sense: CTT CCT ATC TCT CAC AG antisense: TCA CTT GCT CCA AAT ACC	51,7	647
Exon	Sequência dos <i>primers</i> (5' – 3') <i>G6PT1</i>	Ta	pb
2	sense: AGG CTG TGC GTC TTG GCT GGT AGGG antisense: TTC TGT GTC CCC AGG TCC ACC A	63,7	232
3	sense: CCT TCT TTC ATT GCT CCT GTG TTT antisense: CTC TAT GAC AAT CCA AAC AGG CTC	56,7	337
4 e 5	sense: CTG CCC CAT CTG ACC CCA CCC TCA antisense: AGT GGT CGG TCT GGG TGG GGG CTC	63,7	342
6	sense: GGG GAG AGC AGT CAG GGC AGA GCC T antisense: CTG CTC CTT ATG CCC ACC CTT GTC	56,7	250
7	sense: TCC CTC TTC CCA CCA CAA CTC CCT antisense: CCC TTC TCC TTC CTG TCC CTT CTG	57,8	150
8	sense: TGT TCT GAG GAC GTG ACA TTG CCG antisense: CCT TGT GCC CTG CCG TGA GCC	57,3	191
9	sense: TCT GGG CCT GGT TTT CTT TTC TTC antisense: GTG AGA CAG ACC AGG AGA AAA AC	60,1	148
10	sense: CTC TGA ATG CCA CTC CAC TCT GCC antisense: ACA GGT GGG GGT GAG GGA GAG ACT	57,3	213
11	sense: GCT TAG GTT CTT CCC TTT CCC CCT antisense: GAG CGT GCA GGG GGA AGG CCA CC	55,0	389

Todos os reagentes citados foram adicionados a único microtubo de 1,5 mL para garantir a homogeneidade das reações (mistura de reação). O volume de cada reagente utilizado foi multiplicado pelo número de amostras que foram utilizadas na reação. Em seguida, em cada microtubo de 0,2 mL foi pipetado 1µL do DNA genômico (20 ng/µL) previamente extraído e 14,0 µL da mistura de reação, somando um volume total de 15 µL. Em cada análise foi usado como controle negativo um microtubo contendo água no lugar do DNA genômico.

Os microtubos foram levados ao termociclador (PTC-100 Programmable Thermal Controller – MJ Research, Inc.) onde foram submetidos aos ciclos de reação, compostos pelas seguintes fases: desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguida por 35 ciclos de 30 segundos a 95°C; 1 minuto à temperatura de anelamento (*Ta*) específica para cada par de *primers* e 1 minuto a 72 °C; e depois dos ciclos, extensão final a 72 °C por 10 minutos. Para determinar a temperatura de anelamento ideal dos pares de *primers*, foram realizados PCRs com gradientes de temperaturas.

Para amplificação dos *exons* 6, 7, 8, 9, 10 e 11 do gene *G6PT1* foi utilizada a técnica de *Touchdown PCR*¹⁵⁹ a fim de otimizar o processo de amplificação da região de interesse e minimizar o surgimento de bandas inespecíficas. A temperatura de anelamento no primeiro ciclo foi programada para 10°C acima da temperatura de anelamento específica do par de *primers*. Em cada ciclo, a temperatura diminuiu 0,5 °C e, após 20 ciclos, atingiu a temperatura de anelamento ideal. Os demais 15 ciclos foram realizados na temperatura específica dos *primers* (figura 9).

Para verificação da amplificação da PCR foi retirada uma alíquota de 2,0 µL de produto de PCR e misturada com 2 µL de corante azul de bromofenol (bromofenol 0,25% = 0,005 g, Sacarose 40% = 0,8 g, H₂O deionizada = qsp 2,0 mL). A mistura foi aplicada em um gel de agarose 1,5% e submetida a eletroforese e após essa etapa o gel foi corado com

brometo de etídeo (10mg/mL) por cerca de 10 minutos. O gel foi então observado em transiluminador de luz ultra-violeta e fotodocumentado.

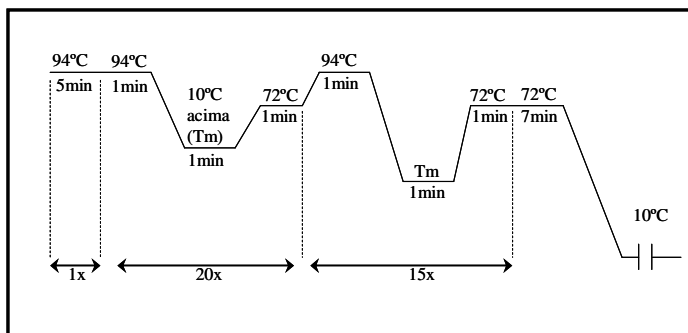


Figura 9: Ciclo utilizado na *Touchdown* PCR.

3.4.3 Sequenciamento automático

Os fragmentos obtidos através da etapa anterior foram diretamente sequenciados através do método de terminação de cadeia¹⁶⁰. Utilizou-se o kit de sequenciamento para o aparelho MegaBACE1000® DYEnamic ET (Amersham Biosciences). O sequenciamento foi realizado em ambas as fitas, sense e antisense, para que a análise fosse feita duas vezes em cada fragmento, aumentando a confiança do resultado.

Os componentes para a reação foram 4 µl de pré-mix, 1,0 µl (5 pmoles) do *primer* sense ou antisense (os mesmos utilizados para a reação de PCR), 2 µl do PCR e completar com água para um volume final de 10 µl. A condição para a reação está representada na figura 10.

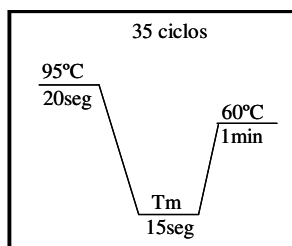


Figura 10: Ciclos utilizados na reação de sequenciamento.

Depois de prontas, as reações foram purificadas utilizando acetato de amônio e etanol, a fim de remover as impurezas que poderiam atrapalhar no sequenciamento. Os resultados obtidos através do sequenciamento foram salvos em eletroferogramas e analisados com os programas *Chromas* e *Generunner*. As sequências foram comparadas com as sequências normais dos genes *G6PC* (número de acesso, ENST00000253801) e *G6PT1* (número de acesso, ENST0000330775) disponibilizadas no banco de dados Ensembl Genome Browser⁸⁴.

As trocas de bases encontradas nos genes foram pesquisadas em banco de dados genéticos para verificação de descrições anteriores. O primeiro tipo de banco utilizado foi de polimorfismos ou SNPs, principalmente o *Single Nucleotide Polymorphism database* (dbSNP) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP>), para verificar se a alteração era comumente encontrada na população e o segundo tipo de banco pesquisado foi de mutações como o *Human Gene Mutation database* (HGMD) (<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>).

3.4.4 Análise de restrição

Uma alteração não descrita na literatura identificada no gene *G6PT1* no paciente 9 foi investigada em indivíduos não afetados (grupo controle), a fim de averiguar a possibilidade de ser um polimorfismo encontrado na população.

A reação de digestão enzimática foi feita para um volume final de 20 µl, contendo 15,0 µl de PCR, 2,0 µl de água, 2,0 µl de tampão específico (fornecido pelo fabricante) e 1,0 µl de enzima. A incubação foi feita a 55°C *overnight*. Os produtos da digestão foram visualizados em gel de acrilamida 12% corado com brometo de etídeo. A alteração cria um sítio específico (GTCTC) de reconhecimento para a enzima *BsMAI*, que cliva o produto amplificado da PCR em fragmentos de 320 e 70 pb.

4 – RESULTADOS

4.1 Amplificação dos *exons*

A amplificação dos fragmentos de interesse dos genes *G6PC* (5 *exons*) e *G6PT1* (10 *exons*), foi realizada através da técnica de PCR, utilizando os iniciadores (*primers*) descritos na tabela 3, que flanqueiam essas regiões. As figuras 11 e 12 mostram os produtos de amplificação dos *exons* e suas respectivas junções *intron-exon* em eletroforese em gel de agarose 1,5 %.

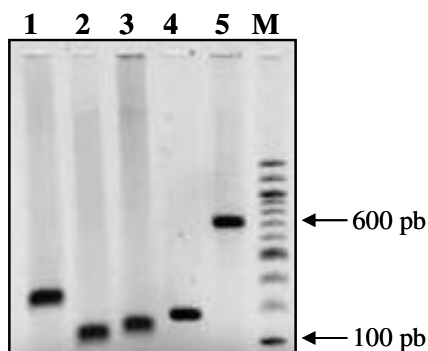


Figura 11: Amplificação dos 5 *exons* do gene *G6PC* através da reação de PCR. M = marcador de peso molecular.

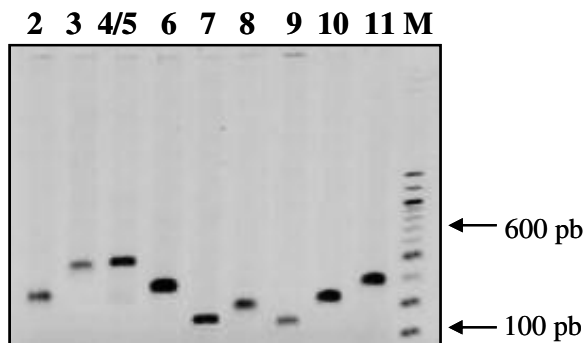


Figura 12: Amplificação dos 10 *exons* do gene *G6PT1* através da reação de PCR. M = marcador de peso molecular.

4.2 Rastreamento de mutações

4.2.1 Gene *G6PC*

Foram detectadas pela leitura do sequenciamento cinco alterações, incluindo três mutações de ponto e dois polimorfismos, todos previamente descritos. A tabela 4 apresenta um resumo das alterações encontradas.

Tabela 4 – Resumo das alterações detectadas.

Local/região	Alteração	Nucleotídeo	Aminoácido
<i>Exon 1</i>	<i>Missense</i> (CM980780)	c.281G>A	G68R
<i>Exon 2</i>	<i>Missense</i> (CM930261)	c.326C>T	R83C
<i>Exon 3</i>	SNP (rs161628)	c.432G>A	—
<i>Exon 5</i>	<i>Nonsense</i> (CM940797)	c.1118C>T	Q347X
3' UTR	SNP (rs2229611)	c.1176T>C	—

Legenda: CM = código de acesso ao HGMD; rs = código de acesso ao dbSNP

A mutação G68R que provoca a troca da base G para A na posição 281, foi encontrada no paciente 5. A mutação de sentido trocado (*missense*) converte o aminoácido Glicina para Arginina no códon 68 (GGA→AGA). A figura 13 ilustra a alteração detectada neste paciente.

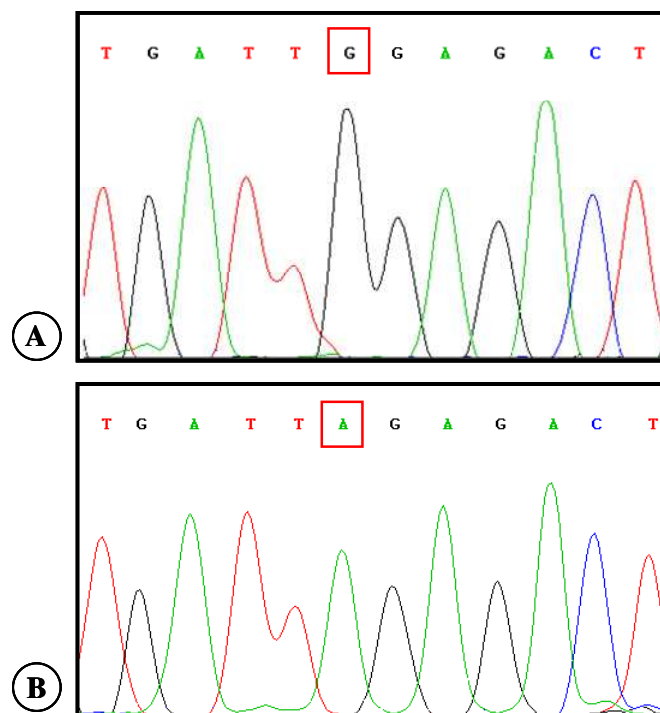


Figura 13: Eletroferograma mostrando a troca da base G por A (quadro vermelho) (mutação G68R) encontrada em homozigose no *exon* 1 do paciente 5; (A) sequência normal e (B) paciente.

Foram encontradas nos pacientes 2, 7 e 8 a troca da base C para T na posição 326 em homozigose nos dois primeiros pacientes e em heterozigose no último (figura 14). A mutação de sentido trocado (*missense*) provoca a substituição do aminoácido Arginina no códon 83 por Cisteína (CGT→ TGT).

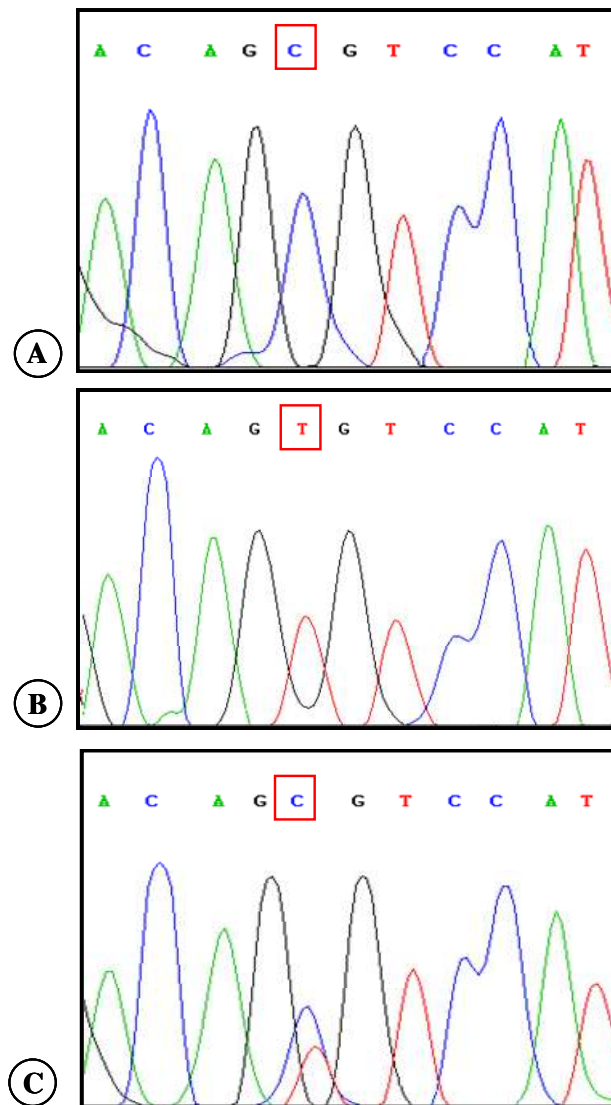


Figura 14: Eletroferograma mostrando a troca da base C por T (quadro vermelho) (mutação R83C) encontrada no *exon* 2 em homozigose nos pacientes 2, 7 e heterozigose no paciente 8; (A) sequência normal, (B) paciente em homozigose e (C) paciente em heterozigose.

A alteração que troca a base C para T na posição 1118 no *exon* 5 foi encontrada em heterozigose no paciente 8, como ilustra a figura 15. A mutação sem sentido (*nonsense*) leva a substituição do aminoácido Glutamina por um códon de terminação (CAG → TAG).

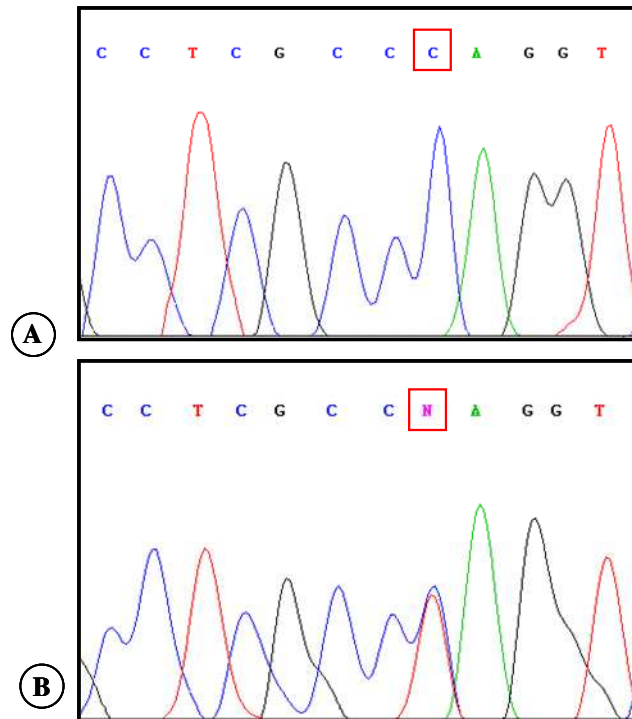


Figura 15: Eletroferograma mostrando a troca da base C por T (quadro vermelho) (mutação Q347X) encontrada em heterozigose no *exon* 5 do paciente 8; (A) sequência normal e (B) paciente.

No *exon* 3 foi detectado no paciente 5 a troca da base G para A na posição 432 (figura 16). Tratando-se de um SNP sinônimo a troca de base no códon não modifica o aminoácido (CCG → CCA).

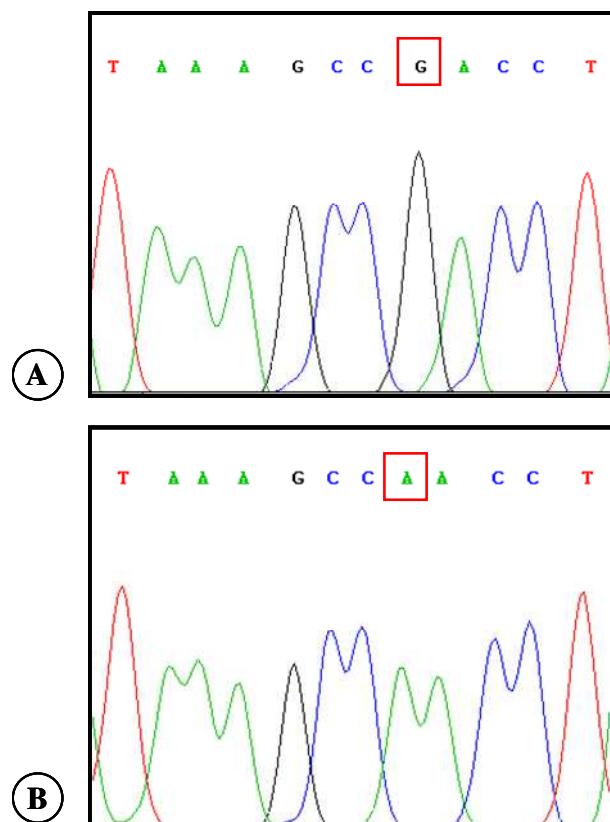


Figura 16: Eletroferograma mostrando a troca da base G por A (quadro vermelho) (SNP c.432 G>A) encontrado em homozigose no *exon* 3 do paciente 5; (A) sequência normal e (B) paciente.

Foi encontrado também, um SNP na região 3' não traduzida, em homozigose nos pacientes 1, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11 e em heterozigose nos pacientes 2, 3, 12 e 13. Essa alteração troca o nucleotídeo T para C na posição 1176 (figura 17).

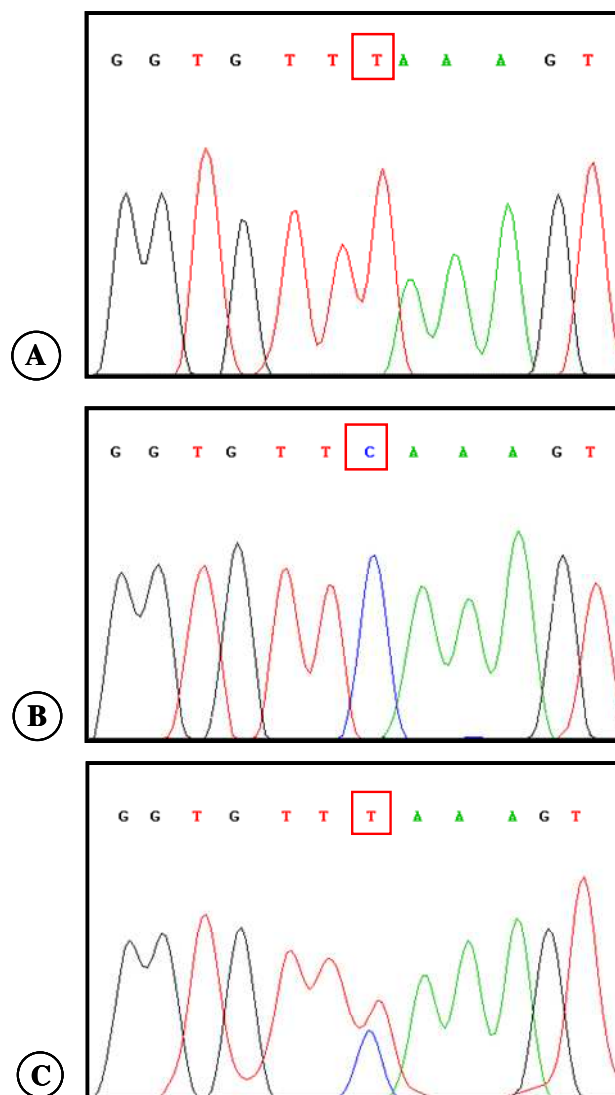


Figura 17: Eletroferograma mostrando a troca da base T por C (quadro vermelho) (SNP c.1176T>C) encontrado na região 3' não traduzida; (A) sequência normal, (B) paciente em homozigose e (C) paciente em heterozigose.

A tabela abaixo mostra o genótipo dos pacientes para as alterações encontradas no gene *G6PC*.

Tabela 5 – Genótipo dos pacientes com relação às alterações encontradas no gene *G6PC*.

PACIENTES	ALTERAÇÃO	GENÓTIPO	
		ALELO 1	ALELO 2
5	<i>Missense</i> <i>SNP</i> (rs161628)	G68R A	G68R A
2	<i>Missense</i> <i>SNP</i> (rs2229611)	R83C T	R83C C
7	<i>Missense</i>	R83C	R83C
8	<i>Missense / Nonsense</i> <i>SNP</i> (rs2229611)	R83C C	Q347X C
1, 4, 6, 7, 9, 10 e 11	<i>SNP</i> (rs2229611)	C	C
3, 12 e 13	<i>SNP</i> (rs2229611)	T	C

Legenda: A = adenina; C = citosina; T = timina.

4.2.2 Gene *G6PT1*

Foram encontradas quatro alterações no gene *G6PT1* responsável pela glicogenose tipo Ib, incluindo uma mutação de ponto conhecida, uma inserção inédita na literatura especializada e dois polimorfismos. A tabela 6 apresenta um resumo das alterações detectadas pelo sequenciamento.

Tabela 6 – Resumo das alterações detectadas no gene *G6PT1*.

Local/região	Alteração	Nucleotídeo	Aminoácido
<i>Exon 4</i>	<i>Missense</i> (CM992334)	c.654G>A	G149E
<i>Exon 11</i>	Inserção	*c.1338_1339insT	<i>frameshift</i>
<i>Exon 11</i>	SNP(rs8192696)	c.1287G>A	—
<i>Intron 7</i>	SNP IVS7.515C>T	c.1076-28C>T	—

Legenda: CM = código de acesso ao HGMD; rs = código de acesso ao dbSNP;

* = mutação inédita

A mutação G149E que provoca a troca da base G por A na posição 654 do *exon 4*, foi encontrada no paciente 6. A mutação de sentido trocado (*missense*) leva a substituição do aminoácido Glicina para Ácido Glutâmico no códon 149 (GGA → GAA). A figura 18 mostra a alteração detectada neste paciente

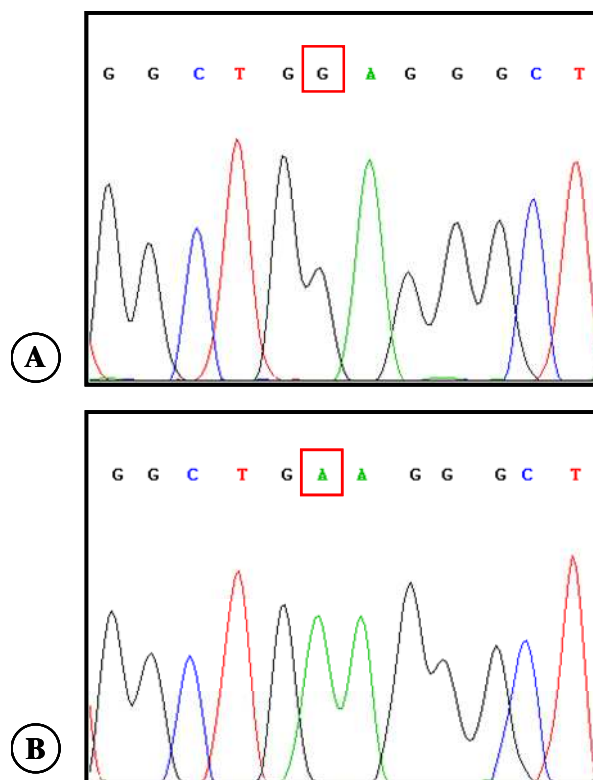


Figura 18: Eletroferograma mostrando a troca da base G por A (quadro vermelho) (mutação G149E) encontrada em homozigose no *exon* 4 do paciente 6; (A) sequência normal e (B) paciente.

No paciente 9 foi detectado uma inserção de base T entre os nucleotídeos 1338 e 1339 do *exon* 11. Esta alteração modificou a matriz de leitura, o que acarretou a mudança de três aminoácidos e um códon de parada (*stop códon*), como ilustra a figura 19.

Para confirmação e análise da inserção, foi utilizado o método de digestão enzimática, conforme mostrado na figura 20. Além disso, a pesquisa da nova mutação foi realizada em 50 indivíduos normais.

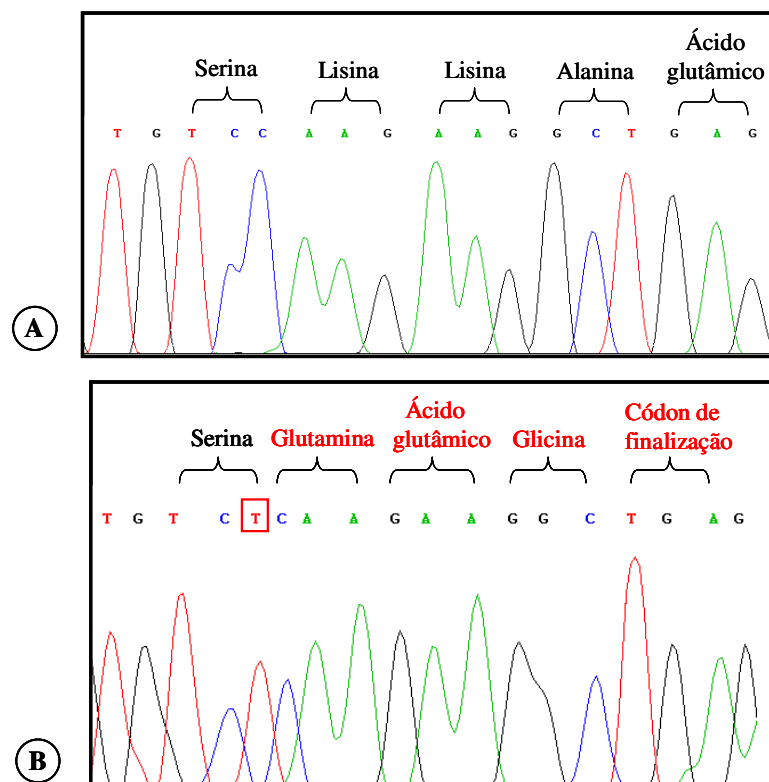


Figura 19: Eletroferograma mostrando a inserção da base T (quadro vermelho) em homozigose encontrada no exon 11 no paciente 9; A partir do ponto de inserção, todos os códons seguintes convertem outros aminoácidos e um códon de parada; (A) sequência normal e (B) paciente em homozigose.

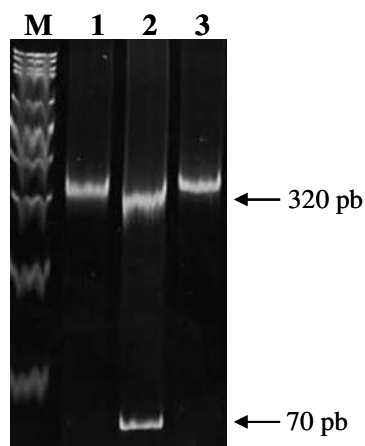


Figura 20: Eletroforese em gel de acrilamida 12% mostrando a digestão enzimática da inserção 1338_1339insT. (M): marcador de 100 pb; (1): PCR não digerida; (2): PCR digerida do paciente portador da inserção e (3) PCR digerida de paciente controle.

No *exon* 11 foi detectado no paciente 12 a troca da base G para A na posição 1287 (figura 21). Tratando-se de um SNP sinônimo a troca da base no códon não modifica o aminoácido (ACG → ACA).

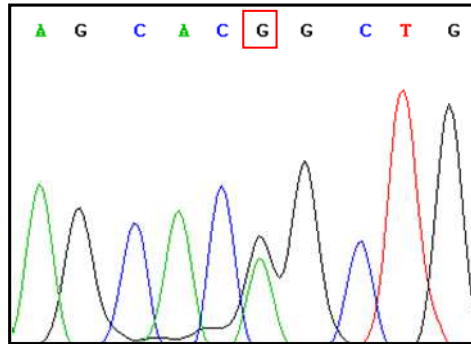


Figura 21: Eletroferograma mostrando a troca da base G por A (quadro vermelho) (SNP c.1287G>A) encontrada em heterozigose no *exon* 11 do paciente 12.

Foi detectado também um *SNP* em heterozigose no *intron* 7, não descrito na literatura, em todos os pacientes. Esta alteração troca a base C por T (c.1076-28C>T).

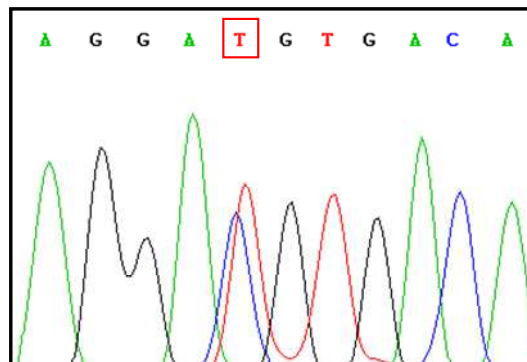


Figura 22: Eletroferograma mostrando a troca da base C por T (quadro vermelho) (SNP c.1076-28C>T) encontrado em heterozigose no *intron* 7.

A tabela abaixo mostra o genótipo dos pacientes para as alterações encontradas no gene *G6PT1*.

Tabela 7 – Genótipo dos pacientes com relação às alterações encontradas no gene *G6PT1*

PACIENTES	ALTERAÇÃO	GENÓTIPO	
		ALELO 1	ALELO 2
6	<i>Missense</i> <i>SNP</i> (IVS7.515C>T)	G149E C	G149E T
9	Frameshift <i>SNP</i> (IVS7.515C>T)	1338_1339insT C	1338_1339insT T
12	<i>SNP</i> (rs8192696)	G	A
1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 10, 11 12 e 13	<i>SNP</i> (IVS7.515C>T)	C	T

Legenda: A = adenina; C = citosina; T = timina.

5 – DISCUSSÃO

A amostra foi composta por 13 indivíduos, sendo oito do sexo masculino e cinco do sexo feminino, dos quais foi confirmada a presença de mutação em três homens e em três mulheres, portanto dentro do esperado para a distribuição de sexo em uma doença autossômica recessiva.

Ainda em relação aos dados clínicos, a idade no primeiro atendimento variou de oito a 288 meses, com uma média de 57,2 meses. Esse dado, embora possa sugerir um diagnóstico tardio, encontra-se enviesado pois ao menos três dos indivíduos haviam sido encaminhados para este serviço após diagnóstico e tratamento inicial em outro centro. De todo modo, a menor idade verificada, ou seja, oito meses, indica que o diagnóstico clínico continua tardio para uma doença potencialmente grave e provavelmente reflete desconhecimento dos seus sintomas por parte da maioria dos pediatras.

Doenças com herança autossômica recessiva tendem a ser raras na população geral. Quanto mais rara a mutação, maior é a taxa de pais consanguíneos entre os afetados¹⁶¹. Na presente amostra, dos seis casos com mutações identificadas, três apresentavam pais consanguíneos. Essa situação parece indicar que a frequência gênica não é necessariamente rara na população estudada.

Por fim, na maioria dos casos nos quais mutações deletérias foram identificadas em um dos dois genes estudados, o diagnóstico clínico foi confirmado pelos achados moleculares. Apenas em um indivíduo houve suspeita inicial de tipo Ia, tendo sido encontrada mutação no gene *G6PT1*. Esse fato pode ser explicado pela ausência de neutropenia neste paciente, fato que levou ao diagnóstico do subtipo Ia. Na realidade, a neutropenia não é manifestada por todos os pacientes^{162,163}. Ela é encontrada em apenas 20% dos casos do subtipo Ib¹⁶⁴ e foi proposto que poderia ser devido a mutações com atividade residual do transportador¹⁶². Portanto, sua ausência não exclui a necessidade de investigação desse gene.

Apesar do reconhecimento dos mecanismos bioquímicos e moleculares envolvidos na doença, o diagnóstico tardio ainda é visto. Esses achados podem ser explicados por se tratar de um quadro clínico sutil ou do desconhecimento dessa condição, o que levaria a uma demora no encaminhamento ao centro de referência¹⁶⁵. Desse modo, a importância do diagnóstico precoce e o seguimento adequado do paciente são essenciais, dada as consequências decorrentes das alterações metabólicas.

A investigação molecular das mutações mais frequentes e eventualmente também de não descritas, possibilita um método rápido, seguro e sem a necessidade de procedimentos invasivos, visto que as mutações estão presentes nas células germinativas, o que permite utilizar amostras de sangue.

Em sete pacientes com sintomas clínicos sugestivos de GSDIa e GSDIb não foram encontradas mutações nas regiões codificantes (*exons*) e de parte dos *introns* adjacentes, que pudessem estar relacionadas com a doença. Mutações em outras partes do gene, como regiões não codificadoras (*introns*), promotoras, sítios de controle por miRNAs ou de outras regiões que interajam a distância, fazem com que nem todas as mutações sejam identificadas pelo sequenciamento da região codificadora.

Outra explicação para o resultado negativo é naturalmente, a possibilidade de outro diagnóstico, ou ainda outros genes envolvidos. Mesmo com uma cuidadosa avaliação baseada nas alterações laboratoriais e clínicas, pacientes com GSDId e tipo III podem ser indistinguíveis clínica e laboratorialmente. Assim, a existência de resultados falsos negativos também é possível.

A seguir será discutida cada alteração detectada nos genes *G6PC* e *G6PT1*.

5.1 Mutações encontradas no gene *G6PC*

5.1.1 Mutação G68R

A mutação pontual G68R foi encontrada no *exon* 1 em homozigose na paciente 5, filha de casal consanguíneo e previamente estudada por Reis (2001)⁷³. A troca da base G por A no nucleotídeo 281, faz com que o códon (posição 68) codifique o aminoácido Arginina, em vez de um Glicina.

De qualquer maneira, ainda não foi possível a realização funcional (estudos de expressão) para verificação se esta mutação causa diminuição ou até mesmo abole a atividade da enzima G6Pase. Entretanto, sua localização na hélice transmembrânica, região cuja integridade é fundamental para sua atividade enzimática, pode influenciar na estabilidade estrutural e desse modo em sua atividade. Esses aspectos sugerem que a mutação possa estar relacionada com o fenótipo encontrado na paciente.

5.1.2 Mutação R83C

A mutação R83C (situada no *exon* 2) é apontada como uma das mais frequentes, tanto na literatura internacional^{46,58,62} como em nosso meio⁷³. Esses dados corroboram com nossos achados, que identifica esta alteração como a mais encontrada, com uma frequência de 50% dentre os alelos mutantes. Nesse contexto, a avaliação dessa mutação através da técnica de RFLP, pode permitir a realização do diagnóstico da doença sem a necessidade do sequenciamento automatizado, reduzindo o custo e o tempo de realização do exame, visto que a mutação altera sítio de restrição de enzima conhecida (*HgaI*).

A Arginina do códon 83 contribui para o centro ativo da enzima. É sugerido também que este aminoácido esteja envolvido no posicionamento do fosfato presente na glicose 6-fosfato, que na verdade é o substrato da enzima⁵⁷.

Estudos de expressão mostraram que o mutante R83C não apresenta atividade detectável da glicose 6-fosfatase⁴⁴. Sua substituição por outros aminoácidos, como por exemplo, pela Cisteína encontrado em homozigose nos pacientes 2, 7 e em heterozigose no 8, produz mutantes sem atividade enzimática G6Pase, o que demonstra que a Arginina no códon 83 é absolutamente necessária para atividade catalítica da enzima⁵⁷.

5.1.3 Mutação Q347X

Esta alteração também é observada com frequência nos indivíduos com deficiência da G6Pase, sendo comum entre portadores caucasianos nos Estados Unidos⁵⁷ e na Europa (sul e noroeste), apresentando 70% de todos os alelos mutantes nessas regiões⁶⁰. Apesar disso, em nossa amostra ela foi detectada apenas em heterozigose no paciente 8.

Essa alteração localizada no *exon 5* promove a conversão de uma Glutamina na posição 347 a um códon de terminação, o que acarreta uma proteína truncada de 346 aminoácidos. A G6Pase selvagem apresenta 357 resíduos totais, ou seja, quando codificada a partir de um mutante, apresenta 11 aminoácidos a menos na região carboxi-terminal. Experimentos de expressão transiente e de mutagênese sítio dirigida relataram que esta mutação provoca a inatividade da enzima G6Pase⁵⁵.

Esse paciente não é filho de casal consanguíneo e o outro alelo mutado corresponde a alteração R83C, mencionado anteriormente.

5.2 Mutações encontradas no gene *G6PT1*

5.2.1 Mutação G149E

A mutação *missense* G149E detectada no *exon* 4 que troca o aminoácido Glicina por um Ácido Glutâmico na posição 149, foi detectado em homozigose no paciente 6.

De acordo com LAM e colaboradores (1999) o aminoácido Glicina na posição 149 está situado no domínio transmembrânico da enzima glicose 6 fosfato-translocase, e que formas mutantes estaria envolvidas em prováveis mudanças na conformação da translocase. O resíduo da Glicina é conservado das bactérias aos mamíferos, incluindo o rato e os seres humanos, sugerindo que este resíduo é crítico para o funcionamento normal da translocase¹²⁷.

Essa mutação só foi relatada uma vez, em uma família chinesa¹²⁸, mas o indivíduo 6 não pertence a esta etnia.

5.2.2 Mutação *frameshift* 1338-1339insT

Durante o estudo foi identificada uma nova mutação no paciente 9. A alteração do tipo *frameshift* (mudança de matriz de leitura) inseriu uma base T entre os nucleotídeos 1338 e 1339 do *exon* 11.

Ainda não foi possível o estudo funcional para verificação se esta mutação causa diminuição ou até mesmo abolição da G6Pase translocase sendo, dessa forma, responsável pelos sintomas do paciente em questão. Entretanto, vários aspectos, corroboram a hipótese.

Em primeiro lugar, no processo de síntese protéica, cada trinca de bases corresponde a um determinado aminoácido. Com a inserção da base T, ocorreu o deslocamento do quadro de leitura, resultando em uma sequência de diferentes aminoácidos e um códon de parada

prematura, o que poderá impedir o funcionamento normal da enzima. Segundo, neste paciente nenhum outro tipo de mutação gênica foi encontrado na região codificadora que pudesse explicar seu fenótipo. Terceiro, a chance de que ambos os genitores sejam portadores de um alelo mutante no mesmo *locus* aumenta substancialmente se eles forem parentes e cada um tiver herdado o alelo a partir de um ancestral comum. Os genitores desse paciente são primos em 1º grau, o que acarretou que a criança recebesse ambos os alelos deletérios. Quarto, a alteração não foi encontrada em 100 alelos de indivíduos normais não relacionados, excluindo a possibilidade de que se trate de polimorfismo neutro.

Dessa forma, identificamos uma mutação deletéria ainda não descrita na literatura especializada, cujos aspectos citados, fortemente sugerem que seja responsável pela ocorrência da glicogenose tipo Ib em nosso meio.

6 – CONCLUSÕES

1. A análise molecular dos genes *G6PC* e *G6PT1* permite a realização do diagnóstico da GSDIa e Ib, de forma segura, sem a necessidade da realização de biópsia hepática. Assim, o protocolo molecular utilizado auxiliou na confirmação diagnóstica de seis casos, evitando o referido procedimento.
2. O estudo de ambos os genes deve ser considerado na investigação dessa condição para definir os subtipos envolvidos. No caso de ausência de alterações no gene *G6PC*, sugere-se o rastreamento no gene *G6PT1*.
3. A frequência das mutações em nosso meio é semelhante à observada na literatura, na qual a mutação R83C também é a mais frequente. Diante disso, na investigação de casos suspeitos de GSD, propõe-se iniciar a avaliação pela pesquisa desta alteração por meio de teste rápido através da técnica de RFLP, o que reduz o tempo e o insumo necessário e também permitem que laboratórios com menor-infraestrutura realizem a análise. Porém, dada a alta porcentagem de heterozigotos afetados por uma mutação desconhecida, o sequenciamento para detecção de novas mutações é necessário.
4. O presente trabalho identificou uma nova mutação à literatura (1338_1339insT).
5. O estudo molecular desta condição representa uma ferramenta adicional para o aconselhamento genético adequado aos casais, proporcionando também orientação aos outros familiares que podem ser genotipados a partir da identificação da mutação no caso índice da família. O estudo molecular abre também a possibilidade do diagnóstico precoce que é importante para estabelecer um tratamento correto aos pacientes, evitando o surgimento de complicações tardias e melhorando a qualidade de vida do paciente.

7 – BIBLIOGRAFIA

1. ARAÚJO, A.P.Q.C. Psychiatric features of metabolic disorders. *Rev Psiqu Clin.* 31(6): 285-9, 2004.
2. WABER, L. Inborn Errors of Metabolism. *Ped. Ann.* 19 (2): 105-117, 1990.
3. MARTINS, A.M. Inborn errors of metabolism: a clinical overview. *Sao Paulo Med J. Rev Paul Med.* 117(6):251-65, 1999.
4. SANSEVERINO MTV, WAJNER M, GIUGLIANI R. Aplicação de um protocolo clínico-laboratorial para identificação de erros inatos do metabolismo em crianças gravemente enfermas. *J Pediatr*; 76(5): 375-82, 2000.
5. MARTINS AM. Erros Inatos do Metabolismo: Abordagem Clínica, 2ª ed. São Paulo, 2003.
6. SAUDUBRAY, J.M.; CHARPENTIER, C. Clinical Phenotypes: Diagnosis/Algorithms. In: SCRIVER, C.R.; BEAUDET, L.; SLY, W.S.; VALLE, D. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, chapter 5, pp. 327-400, 1995.
7. JR-HAY WW, HAYWARD RA, LEVIN NJ, SONDHEIMER JM. *Pediatria Diagnóstico e Tratamento – Current*. Editora Mc-Graw-Hill , Rio de Janeiro – RJ, 2004.
8. MARTINS, A.M. Erros Inatos do Metabolismo: Abordagem Clínica, 2ª ed. São Paulo, 2003.
9. MOWAT, AP. Doenças hepáticas em pediatria. 2 edição. Editora revinter, Rio de Janeiro, 1991.
10. CHEN, Y.T.; BURCHELL, A. A Glycogen storage disease. In: Scriver, C.R.; Beaudet, A.L.; Sly, W.S.; Valle, D. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. 7th ed. New York, McGraw-Hill, p.935-65, 1995.
11. LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. *Principles of Biochemistry*. 4 edição. São Paulo: Sarvier, 2006.
12. DIAMENT, A.; RAMOS, J.L.A. Erros inatos do metabolismo dos carboidratos. In: Diament A, Cypel S, coordenadores. *Neurologia Infantil*. 3a ed. São Paulo: Atheneu;, p.442-58, 1996.
13. GUYTON, A.C. Metabolismo dos glicídios e formação de adenosina-trifosfato. In: Guyton, A.C. *Tratado de fisiologia médica*. Rio de Janeiro: Interamericana; p.798-805, 1976.
14. NORDLIE, R. C.; FOSTER, J. D.; LANGE, A. J. Regulation of glucose production by the liver. *Ann. Rev. Nutr.* v. 19, n. p. 379-406, 1999.

15. DEVLIN, T.M. Biochemistry with clinical correlations, 4th ed. Wiley, New York, 1997.
16. DRASH, A. L. Causes of hypoglycemia. In Lifshitz, F. - Pediatric Endocrinology - A clinical Guide. New York, Marcel Dekker, p. 479, 1985.
17. HAYMOND, M.W. Hypoglycemia in infants and children. *Endocrinol Metab Clin North Am*; 18: 211-252, 1989.
18. RUBIN, E.; GORSTEIN, F.; SCHWARTING, R.; RUBIN, R.; STRAYER, D. Patologia. Bases Clinicopatológicas da Medicina, 4^o ed Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.
19. SHEPHERD, P.R.; NAVE, B.T.; SIDDLE, K. Insulin stimulation of glycogen synthesis and glycogen synthase activity is blocked by wortmannin and rapamycin in 3t3-L1 adipocytes: evidence for the involvement of phosphoinositide 3-kinase and p70 ribosomal protein-S6 kinase. *Biochem J.* 305:25-8, 1995.
20. GHISHAN, F.K.; BALLEW, M. Inborn errors of carbohydrate metabolism. In: Suchy FJ. Liver disease in children. 1 ed. St. Louis: CV Mosby; p.731-38, 1994.
21. DIAMENT, A.; SCHMIDT, B. J.; RAMOS, J.L.A.- Erros inatos do metabolismo. In: Marcondes, E. - Pediatria Básica. 8ed. São Paulo, Sarvier; p.722-726, 1994.
22. HERS, H.G.; VAN HOOFF, F.; DE BARSY, T. Glycogen storage disease. In: Scriver, C.R.; Beaudet, A.L.; Sly, W.S.; Valle, D. The metabolic and molecular bases of inherited disease. 6th ed. New York, McGraw-Hill; p.425, 1989.
23. ALAGILLE, D. Inborn errors of metabolism. In: Roy C.C.; Silverman, A; Alagille D. Pediatric Clinical Gastroenterology. 4^{ed}, Mosby St.Louis; p.812-76, 1995.
24. BURCHELL, A. Molecular pathology of glucose-6-phosphatase. *FASEB J* 4: 2978-2988, 1990.
25. CALÇADO, A.C. Glicogenoses hepáticas. In: Penna, F.J.; Mota, J.A.C.; Roquete, M.L.V.; Ottoni, C.M.C. Doenças do fígado e das vias biliares na infância. Parte 1. Rio de Janeiro: MEDSI; p.149-88, 1996.
26. SNAPPES, I.; VAN CREVELD, S.; Un cas d'hypoglycémie avec chez un enfant. *Bull Mem Soc Med Hop.* 52:1315, 1928.
27. CORI, G.T. Glycogen structure and enzyme deficiencies in glycogen storage disease. *Harvey Lect* 48: 145, 1954.
28. CHEN, Y.T.; BALI, D.; SULLIVAN, J.; Prenatal diagnosis in glycogen storage diseases. *Prenatal Diagnosis* 22:357-9, 2001.
29. DIMAURO, S.; LAMPERTI, C. Muscle glycogenoses. *Muscle Nerve* 24(8):984-99, 2001.

30. BARRERA, L.; ALGARÍN, C.; RODRÍGUEZ, F.; BERMÚDEZ, M.; SANDOVAL, H.; DONADO, M.I. Diagnostico clinico bioquímico de la enfermedad de Pompe. *Acta Médica Colombiana* 18(3):172-6, 1993.
31. GIOVANNINI, M.; BIASUCCI, G.; LUOTTI, D.; FIORI, L.; RIVA, E. Nutrition in children affected by inherited metabolic diseases. *Ann Ist Super Sanità* 31(4):489-502, 1995.
32. CHEN, Y.T. The glicogenoses. In: Rudolph, A.M. (ed). *Rudolph's Pediatrics*. Norwalk, C.T.; Appleton & lange; p.331, 1991.
33. VON GIERKE, E. Hepato-nephro-megalia glycogenica. *Beitr. Pathol. Anat.* 82: 497, 1929.
34. CORI, G.T.; CORI, C.F. Glucose 6-phosphatase of the liver in glycogen storage disease. *J. Biol. Chem.*, 199:661, 1952.
35. OCKERMAN, P.A. Assay by a spectrofluorimetric method of glucose-6-phosphate in the liver in glycogen storage disease type 1. *Clin Chim Acta.* 12(4): 445-52, 1965.
36. JEVON, G.P.; FINEGOLD, M.J. Reliability of histological criteria in glycogen storage disease of the liver. *Pediatr Pathol.* 14(4): 709-21, 1994.
37. McADAMS, A.J.; HUG, G.; BOVE, K.E. Glycogen storage disease types I to X, Criteria for morphologic diagnosis. *Hum. Pathol.*, 5: 463-487, 1974.
38. Site didático de Anatomia Patológica, Neuropatologia e Neuroimagem. Faculdade de Ciências Médicas (FCM) – Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). <<http://anatpat.unicamp.br>> Acessado em 6 de Setembro de 2010.
39. CHOU, J.Y.; MATERN, D.; MANSFIELD, B.C.; CHEN, Y-T. Type I glycogen storage diseases: disorders of the glucose-6-phosphatase complex. *Curr Mol Med* 2:121–143, 2002.
40. FAGUNDES, E.D.T.; FERREIRA, A.R.; ROQUETE, M.L.V. Glicogenoses. In: Ferreira CT, Carvalho E, Silva LR. *Gastroenterologia e Hepatologia em pediatria: Diagnóstico e Tratamento*. Brasil: Rio de janeiro, 645-657, 2003.
41. CHOU, J.Y. MANSFIELD, B.C. Molecular genetics of type 1 glycogen storage diseases. *TEM.*, 10: 104, 1999.
42. WEGMANN, R; MELLO DE OLIVEIRA, J.A.. Histoenzymological test in vitro of the role of glucose in the regulation of the glucose-6-phosphatase activity in the beta cells of Langerhans islets. *Ann. Histochem.*, 14: 405-413, 1969.
43. COUNTAWAY, J.L.; WADELL, I.D.; BURCHELL, A.; ARION, W.J. The phosphohydrolase component of the hepatic microsomal glucose 6-phosphatase system in a 36.5 kilodalton polypeptide. *J. Biol. Chem.*, 263: 2673, 1988.

44. LEI, K. J.; SHELLY, L.L.; PAN, C.; SIDBURY, J.B.; CHOU, J.Y. Mutations in the glucose 6-phosphatase gene that cause glycogen storage disease type 1a . *Science* 262:580, 1993.
45. PAN, C.J.; LEI, K.J.; ANNABI, B.; HEMRIKA, W.; CHOU, J.Y. Transmembrane topology of glucose-6-phosphatase. *J Biol Chem*, 273:6144, 1998.
46. RAKE, J.P.; TEN BERGE, A.M.; VERLIND, E.; VISSER, G.; VERLIND, E.; NIEZEN-KONING, K.E.; BUYS, C.H.; SMIT, G.P.A.; SCHEFFER, H. Glycogen storage disease type 1a: recent experience with mutation analysis, a summary of mutations reported in the literature and a newly developed diagnostic flowchart. *Eur J Pediatr*;159:322–330, 2000.
47. VAN SCHAFTINGEN E, GERIN I. The glucose-6-phosphatase system. *Biochem J*;362:513-32, 2002.
48. NORDLIE, R.C.; SUKALSKI, K.A.; MUNOZ, J.J.; BALDWIN, J.J. Type 1c, a novel glycogenosis. Underlying mechanisms. *J Biol Chem* 258: 9739, 1983.
49. VEIGA-DA-CUNHA, M.; GERIN, I.; CHEN, Y.T.; BARSY, T.; LONLAY, P.; DIONISIVICI, C.; FENSKE, C.D.; LEE, P.J.; LEONARD, J.V.; MAIRE, I.; ROSELL, A.M.; SCHWEITZER, M.V.; SCHAFTINGEN, E.V. A gene on chromosome 11q23 coding for a putative glucose-6-phosphate translocase is mutated in glycogen storage disease types 1b e 1c. *Am J. Hum. Genet.*, 63:976-83, 1998.
50. VEIGA-DA-CUNHA, M.; GERIN, I., VAN SCHAFTINGEN, E. How many forms of glycogen storage disease type I? *Eur J Pediatr*, 159, 2000.
51. SHELLY, L.L.; LEI, K.J.; PAN, C.J.; SAKATA, S.F.; RUPPERT, S.; SCHUTZ, G.; CHOU, J.Y. Isolation of the gene for murine glucose-6-phosphatase, the enzyme deficient in glycogen storage disease type 1a. *J Biol Chem* 268: 21482-85, 1993.
52. WEINSTEIN D.A.; WOLFSDORF, J.L. Glycogen storage diseases: a primer for clinicians. *The endocrinologist*, 12:531-538, 2002.
53. MATERN, D.; SEYDEWITZ, H.H.; BALI, D.; LANG, C.; CHEN ,Y.T. Glycogen storage disease type I: diagnosis and phenotype/genotype correlation. *Eur JPediatr.*;161 1:S10–S19, 2002.
54. PAN, C.J.; LEI, K.J.; CHEN, H.; WARD, J.M.; CHOU, J.Y. Ontogeny of the murine glucose-6-phosphatase system. *Arch Biochem Biophys* 358:17–24, 1998.
55. LEI, K.J.; PAN, C.J.; SHELLY, L.L.; LIU, J.L.; CHOU, J.Y. Identification of mutations in the gene for glucose-6-phosphatase, the enzyme deficient in glycogen storage disease type 1a. *J Clin Invest.*;93:1994–1999, 1994.
56. LEI, K.J.; CHEN, Y.T.; CHEN, H.; WONG, L.J.C.; LIU, J.L.; MCONKIE-ROSELL, A.; VAN HOVE, J.L.K.; OU, H.C.Y.; YEH, N.J.; PAN, L.Y.; CHOU, J.Y. Genetic basis of glycogen storage disease type 1a: prevalent mutations at the glucose-6-phosphatase locus. *Am J Hum Genet* 57: 766-771, 1995.

57. LEI, K.J.; SHELLY, L.L.; LIN, B.; SIDBURY, J.B.; CHEN, Y.T.; NORDLIE, R.C.; CHOU, J.Y. Mutations in the glucose-6-phosphatase gene are associated with glycogen storage disease type 1a and 1aSP but not 1b and 1c. *J Clin Invest* ;95:234–240, 1995.
58. PARVARI, R.; MOSES, S.; HERSHKOVITZ, E.; CARMI, R.; BASHAN, N. Characterization of the mutations in the glucose-6-phosphatase gene in Israeli patients with glycogen storage disease type 1a: R83C in six Jews and a novel V166G mutation in a Muslim Arab. *J Inher Metab Dis*;18:21–27, 1995.
59. HWU, W.L.; CHUANG, S.C.; HUAANG, S.F.; CHANG, M.H.; WEN, W.H.; WANG T.R. Hypercalcemia in glycogen storage disease type 1a: a case with R83C and 341delG mutations. *J Inher Metab Dis*.;22:937–938, 1999.
60. CHEVALIER-PORST, F.; BOZON, D.; BONARDOT, A.; BRUNI, N.; MITHIEUX, G.; MATHEU, M.; MAIRE, I. Mutation analysis in 24 French patients with glycogen storage disease type 1a. *J Med Genet* 33: 358, 1996.
61. LEE, W.J.; LEE, H.M.; CHI, C.S.; SHU, S.G.; LIN, L.Y.; LIN, W.H. Genetic analysis of the glucose-6-phosphatase mutation of type 1a glycogen storage disease in a Chinese family. *Clin Genet*; 50:206–211, 1996.
62. PARVARI, R.; LEI, K.J.; BASHAN, N.; HERSHKOVITZ, E.; STANLEY, H.K.; BARASH, V.; LERMAN-SAGIE, T.; MANDEL, H.; CHOU, J.Y.; MOSES, S. Glycogen storage disease type 1a in Israel. Biochemical, clinical, and mutational studies. *Am J Med Genet* ;72:286–290, 1997.
63. KELLER, K.M.; SCHUTZ, M.; PODSKARBI, T.; BINDL, L.; LENTZE, M.J.; SHIN Y.S. A new mutation of the glucose-6-phosphatase gene in a 4-year-old girl with oligosymptomatic glycogen storage disease type 1a. *J Pediat*; 132:360–361, 1998.
64. STROPPIANO, M.; MAZZOTTI, R.; REGIS, S.; GATTI, R. New mutation (S298P) in a patient with glycogen storage disease type 1a. *Hum. Mut.* S329,1998.
65. 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 Inher Metab Dis*;22:43–49, 1999.
66. TRIOCHE, P.; FRANCOUAL, J.; CHALAS, J.; CAPEL, L.; LINDENBAUM, A.; ODIEVRE, M.; LABRUNE, P. Genetic heterogeneity of glycogen storage disease type 1a in France: a study of 48 patients. *Hum Mutat*;16:444, 2000.
67. Wu MC, Tsai FJ, Le CC, Lin SP, Wu JY. Identification of a novel missense mutation (T16A) in the glucose-6-phosphatase gene in a Taiwan Chinese patient with glycogen storage disease 1a. *Hum Mut*, 2000.
68. 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.

69. AKANUMA, J.; NISHIGAKI, T.; FUJII, K.; MATSUBARA, Y.; INUI, K.; TAKAHASHI, K.; KURE, S.; SUZUKI, Y.; OHURA, T.; MIYABAYASHI, S.; OGAWA, E.; IINUMA, K.; OKADA, S.; NARISAWA, K. Glycogen storage disease type Ia: molecular diagnosis of 51 Japanese patients and characterization of slicing mutations by analysis of ectopically transcribed mRNA from lymphoblastoid cells. *Am J Med Genet*;91:107–112, 2000.
70. GOTO, M.; TAKI, T.; SUGIE, H.; MIKI, Y.; KATO, H.; HAYASHI, Y. A novel mutation in the glucose-6-phosphatase gene in Korean twins with glycogen storage disease type Ia. *J Inherit Metab Dis*;23:851–852, 2000.
71. ROCHA, H.; CABRAL, A.; VILARINHO, L. Identification of a novel mutation (Q24X) in the glucose-6-phosphatase gene of a Portuguese patient with GSD-Ia. *Hum Mutat*;16:449, 2000.
72. KOZAK, L.; FRANCOVA, H.; HIRABINCOVA, E.; STASTNA, S.; PESKOVA, K.; ELLEDER, M. Identification of mutations in the glucose-6-phosphatase gene in Czech and Slovak patients with glycogen storage disease type Ia, including novel mutations K76N, V166A, and 540del5. *Hum Mutat*;16:89, 2000.
73. REIS, F.C.; CALDAS, H.C.; NORATO, D.Y.; SCHWARTZ, I.V.; GIUGLIANI, R.; BURIN, M.G.; SARTORATO, E.L. Glycogen storage disease type Ia: molecular study in Brazilian patients. *J Hum Genet*;46:146–149, 2001.
74. Wong LJC, Hwu WL, Dai P, Chen TJ. Molecular genetics of glycogen storage disease type Ia in Chinese patients of Taiwan. *Mol Genet Metab*;72:175–180, 2001.
75. ANGARONI, C.J.; DODELSON-KREMER, R.; ARGARAÑA, C.E.; PASCHINI-CAPRA, A.E.; GINER-AYALA, A.N.; PEZZA, R.J.; PAN, C.J.; CHOU, J.Y. Glycogen Storage Disease Type Ia in Argentina. Two novel Glucose-6-phosphatase mutations affecting protein stability. *Mol Genet Metab*;83:276–279, 2004.
76. LI, D.Z.; LIAO, C.; TANG, X.W. Prenatal diagnosis of glycogen storage disease type Ia, presenting a new mutation in the glucose-6-phosphatase gene. *Prenat Diagn*;27:685–686, 2007.
77. KI, C.S.; HAN, S.H.; KIM, H.J.; LEE, S.G.; KIM, E.J.; KIM, J.W.; CHOE, Y.H.; SEO, J.K.; CHANG, Y.J.; PARK, J.Y. Mutation spectrum of the glucose-6-phosphatase gene and its implication in molecular diagnosis of Korean patients with storage disease type Ia. *Clin Genet*; 65:487–489, 2004.
78. LAM, C.W.; BUT, W.M.; SHEK, C.C.; TONG, S.F.; CHAN, Y.S.; CHOY, K.W.; TSE, W.Y.; PANG, C.P.; HJELM, N.M. Glucose-6-phosphatase gene (727G→T) splicing mutation is prevalent in Hong Kong Chinese patients with glycogen storage disease type Ia. *Clin Genet*;53:184–190, 1998.
79. CHIANG, S.C.; LEE, Y.M.; CHANG, M.H.; WANG, T.R.; KO, T.M.; HWU, W.L. Glucose-6-phosphatase gene mutations in Taiwan Chinese patients with glycogen storage disease type Ia. *J Hum Genet*;45:197–199, 2000.

80. MEANEY, C.; CRANSTON, T.; LEE, P.; GENET, S. A common 2 bp deletion mutation in the glucose-6-phosphatase gene in Indian patients with glycogen storage disease type Ia. *J Inherit Metab Dis*;24:517–518, 2001.
81. KAJIHARA, S.; MATSUHASHI, S.; YAMAMOTO, K.; KIDO, K.; TSUJI, K.; TANAE, A.; FUJIYAMA, ITOH, T.; TANIGAWA, K.; UCHIDA, M.; SETOGUCHI, Y.; MOTOMURA, M.; MIZUTA, T.; SAKAI, T. 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*, 57: 549-55, 1995.
82. 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*;51:179–183, 1997.
83. OZEN, H. Glycogen storage diseases: new perspectives. *World J Gastroenterol* 13(18): 2541-53, 2007.
84. The Ensembl Project Database. <<http://www.ensembl.org>> Acessado em 24.09.10.
85. RAKE, J.P.; VISSER, G.; LABRUNE, P.; LEONARD, J.V.; ULLRICH, K.; SMIT, G.P.. 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*,161 Suppl 1:S20-34, 2002.
86. NORDLIE, R.C.; SUKALSKI, K.A.; JOHNSON, W.T. Human microsomal glucose-6-phosphate system. *Eur J Pediatr*, 152:S2-S6, 1993.
87. MAIRE I.; BAUSSAN C.; MOATTI, N.; MATHIEU, M.; LEMONNIER, A. Biochemical diagnosis of hepatic glycogen storage diseases: 20 years French experience. *Clin Biochem*, 24:169-78, 1991.
88. ROY, C.C.; SILVERMAN, A.; ALAGILE. Inborn errors of metabolism. In: *Pediatric Clinical Gastroenterology*. Four Edition. P. 812-75, 1993.
89. MOSES, S.W. Pathophysiology and dietary treatment of the glycogen storage diseases. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 11:155-74, 1990.
90. 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. 1521-1551, 2001.
91. COHEN, J.L.; VINIK, A.; FALLER J.; FOX I.H. Hyperuricemia in glycogen storage disease type I. *J Clin Invest*; 75:251-57, 1985.
92. REITSMA-BIERENS, W.C.C. Renal complications in glycogen storage disease type I. *Eur J Pediatr*; 152:S60-S62, 1993.

93. ARION, W.J.; WALLIN, B.K.; LANGE, A.J.; BALLAS, L.M. 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.
94. BANDSMA, R.H.; SMIT, G.P.; KUIPERS, F Disturbed lipid metabolism in glycogen storage disease type 1. *Eur J Pediatr.* 1:S65-9, 2002.
95. McGARRY, J.D.; FOSTER D.W. Regulation of hepatic fatty acid oxidation and ketone body production. *Annu Rev Biochem.* 49:395-420, 1980.
96. UBELS, F.L.; RAKE, J.P.; SMIT, G.P.; SMIT, A.J. Is glycogens storage disease 1a associated with atherosclerosis? *Eur J Pediatr.* 2002 Oct; 161 Suppl 1:S62-4, 2002.
97. CHEN, Y.T. Glycogen storage diseases. In BEHRMAN, R.E.; Kliegman, R.M.; JENSON, H.B.; Nelson Textbook of pediatrics, 17th ed. International edition, Elsevier, p.500, 2004.
98. WOLFSDORF, J.I.; HOLM, I.A.; WEINSTEIN, D.A. Glycogen storage diseases. Phenotypic, genetic, and biochemical characteristics, and therapy. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 28(4): 801-23, 1999.
99. CARVES, C.; DUQUENOY, A.; TOUTAIN, F.; TRIOCHE, P.; ZARNITSKI, C.; LE ROUX, P.; LE LUYER, B. Gouty tendinitis revealing storage disease type Ia in two adolescents. *Joint Bone Spine*; 70(2): 149-53, 2003.
100. CHEN, Y.T.; BAZZARRE, C.H.; LEE, M.M.; SIDBURY, J.B.; COLEMAN, R.A. Type I glycogen storage disease: nine years of management with cornstarch. *Eur J Pediatr*; 152 Suppl 1:S56-9, 1993.
101. MUNDY, H.R.; HINDMARSH, P.C.; MATTHEWS, D.R.; LEONARD, J.V.; LEE, P.J. The regulation of growth in glycogen storage disease type 1. *Clin Endocrinol (Oxf)*; 58(3): 32-9, 2003.
102. KARASAWA, Y.; KOBAYASHI, M.; NAKANO, Y.; AOKI, Y.; KAWA, S.; KIYOSAWA, K.; SEKI, H.; KAWASAKI, S.; FURIHATA, K.; ITOH, N. A case of glycogen storage disease type Ia with multiple hepatic adenomas and G727T mutation in the glucose-6-phosphatase gene, and a comparison with other mutations previously reported. *Am J Gastroenterol* ;93(9):1550-3, 1998.
103. TALENTE, G.M.; COLEMAN, R.A.; ALTER, C.; BAKER, L.; BROWN, B.I.; CANNON, R.A.; ET AL. Glycogen storage disease in adults. *Ann Intern Med.* 120(3): 218-26, 1994.
104. RESTAINO, I.; KAPLAN, B.S.; STANLEY, C.; BAKER, L. Nephrolithiasis, hypocitraturia, and a distal renal tubular acidification defect in type 1 glycogen storage disease. *J Pediatr.* 122(3): 392-6, 1993.
105. LEE, P.J. Glycogen storage disease type I: pathophysiology of liver adenomas. *Eur J Pediatr.* 2002 Oct; 161 Suppl 1:S46-9, 2002.

106. FINK, A.S.; APPELMAN, H.D.; THOMPSON, N.W. Hemorrhage into a hepatic adenoma and type Ia glucogen storage disease: a case report and review of the literature. *Surgery*, 97:117-24, 1985
107. COIRE, C.I.; QIZILBASH, A.H.; CASTELLI, M.F. Hepatic adenomata in type Ia storage disease. *Arch Pathol Lab Med*; 111:166-69, 1987.
108. MILLER, J.H; GATES, G.F.; LANDING, B.H.; KOGUT, M.D.; ROE, T.F. Scintigraphic abnormalities in glycogen storage disease. *J Nucl Med*. 19:354-58, 1978.
109. GROSSMAN, H.; RAM, P.C.; COLEMAN, R.A. et al. Hepatic ultrasonography in type I glycogen storage disease (von Gierke disease): detection of hepatic adenoma and carcinoma. *Radiology*, 141:753-56, 1981
110. HOWELL, R.R.; STEVENSON, R.E.; BEN-MENACHEM, Y.; PHYLIKY, R.L.; BERRY, D.H. Hepatic adenomata with type I glycogen storage disease. *Jama*, 236:1481-84, 1976.
111. BIANCHI, L. Glycogen storage disease I and tumours hepatocelular. *Eur J Pediatr*, 152:S63-S70, 1993.
112. SCHWAHN, B.; RAUCH, F.; WENDEL, U.; SCHONAU, E.; Low bone mass in glycogen storage disease type 1 is associated with reducet muscle force and poor metabolic control. *J Pediatr*; 141(3):350-6, 2002.
113. MUNDY, H.R.; GEORGIADOU, P.; DAVIES, L.C.; COUSINS, A.; LEONARD, J.V.; LEE, P.J. 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, 2005.
114. GERIN, I.; VEIGA-DA-CUNHA, M.; ACHOURI, Y.; COLLET, J.; SCHAFTINGEN, E.V. Sequence of a putative glucose 6-phosphate translocase, mutated in glycogen storage disease type 1b. *FEBS*, 419: 235-38, 1997.
115. ANNABI, B.; HIRAIWA, H.; MANSFIELD, B.C.; LEI, K.; UBAGAI, T.; POLYMEROPOULOS, M.H.; MOSES, S.W.; PARVARI, R.; HERSHKOVITZ, E.; MANDEL, H.; FRYMAN, M.; CHOU, J.Y. The gene for glycogen storage disease type 1b maps chromosome 11q23. *Am J Hum Genet*, 62: 400-05, 1998.
116. MIDDLEDITCH, C.; CLOTTES, E.; BURCHELL, A. A different isoform of the transport protein mutated in the glycogen storage disease 1 b is expresses in brain. *FEBS Lett* 433: 33-36, 1988.
117. PAN, C.J.; LIN, B.; CHOU, J.Y. Transmenbrane topology of human glucose 6-phosphate transporter. *J. Biol. Chem.*, 274: 13865-69, 1999.
118. MARCOLONGO, P.; BARONE, V. Structure and mutation analysis of the glycogen storage disease type 1b gene. *FEBS Lett* 436: 247-250, 1998.

119. KURE, S.; SUZUKI, Y.; MATSUBARA, Y. Molecular analysis of glycogen storage disease type 1b: identification of a prevalent mutation among japanese patients and assignment of a putative glucose-6-phosphate translocase gene to chromosome 11. *Biochem Biophys Res Commun* 248: 426-431, 1998.
120. HIRAIWA, H.; PAN, C.J.; LIN, B.; MOSES, S.W.; CHOU, J.Y. Inactivation of the glucose-6-phosphate transporter causes glycogen storage disease type 1b. *J Biol Chem* 274: 5532-5536, 1999.
121. GALLI, L.; ORRICO, A.; MARCOLONGO, P.; FULCERIA, R.; BURCHELL, A.; MELIS, D.; PARINI, R.; GATTI, R.; LAM, C.; BENEDETTI, A.; SORRENTINO, V.; Mutations in the glucose-6-phosphate transporter (G6PT) gene in patients with glycogen storage diseases type 1b and 1c. *FEBS Lett* 459: 255-258, 1999.
122. HOU, D.C.; KURE, S.; SUZUKI, Y.; HASEGAWA, Y.; HARA, Y.; INOUE, T.; KIDA, Y.; MATSUBARA, Y.; NARISAWA, K. Glycogen storage disease type 1b: structural and mutational analysis of the microsomal glucose-6-phosphate transporter gene. *Am J Med Genet* 86: 253-257, 1999.
123. VEIGA-DA-CUNHA M.; GERIN, I.; CHEN, Y.T.; LEE, P.J.; LEONARD, J.V.; MAIRE, I.; WENDEL, U.; VIKKULA, M.; VAN SCHAFTINGEN, E. The putative glucose-6-phosphate translocase gene is mutated in essentially all cases of glycogen storage disease type I non-a. *Eur. J. Hum. Genet.*, 7:717-23, 1999.
124. SANTER, R.; RISCHWISKI, J.; BLOCK, G.; KINNER, M.; WENDEL, U.; SCHAUB, J.; SCHNEPPENHEIM, R. Molecular analysis in glycogen storage disease 1 non A: DHPLC detection of the highly prevalent exon 8 mutations of the G6PT1 gene in german patients. *Hum mutation.*, 348, 2000.
125. IHARA, K.; KUROMARU, R.; HARA, T. Genomic structure of the human glucose 6-phosphate translocase gene and novel mutations in the gene of a japanese patient with glycogen storage disease type 1b. *Hum Genet* 103: 493-496, 1998.
126. JANECKEL, A.R.; BOSSHARD, N.U.; MAYATEPEK, E.; SCHUKZE, A.; GILZELMAN, R.; BURCHELL, A.; BARTRAM, C.R.; JANSSEN, B. Molecular diagnosis of type 1c glycogen storage disease. *Hum Genet* 104: 275-277, 1999.
127. LAM, W.C.; CHAN, B.Y.; TONG, S.F. Definition of the correct sequence in the donor Splice site of intron 2 in the human glucose-6-phosphate translocase gene. *Febs lett.*, 445:449-450, 1999.
128. LAM, W.C.; CHAN, B.Y.; TONG, S.F.; SIN, S.Y.; LAU, E.T.; LAM, Y.Y.; PON, P. Prenatal diagnosis of glycogen storage disease type 1b using denaturing high performance liquid chromatography. *Prenat Diag.*, 20:765-768, 2000.
129. AMBRUSO, D.R.; McCABE, E.R.B.; ANDERSON D *et al.* Infectious and bleeding complications in patients glycogenosis Ib. *AJDC.* 139:691-7, 1985.

130. IHARA, K.; NOMURA, A.; HIKINO, S.; TAKADA, H.; HARA, T. Quantitative analysis of glucose-6-phosphate translocase gene expression in various human tissues and haematopoietic progenitor cells. *JInherit Metab Dis* 23: 583-592, 2000.
131. PARSCAU, L.; GUIBAUD, P.; MAIRE, I. Les glycogénoses de type 1 b et 1c. *Pédiatrie*. 43:661-5, 1988.
132. WENDEL, U.; SCHROTEN, H.; BURDACH, S.; WAHN, V. Glycogen storage disease type Ib: infectious complications and measures for prevention. *Eur J Pediatr*. 152:S49-S51, 1993.
133. VAN DE WERVE, G.; LANGE, A.; NEWGARD, C.; MÉCHIN, M.; LI, Y.; BERTELOOT, A. New lessons in the regulation of glucose metabolism taught by the glucose 6-phosphatase system. *Eur. J. Biochem.*, 267: 1533-49, 2000.
134. HUGHER, W.T.; ARMSTRONG, D.; BODEY, G.P.; BOW, J.; CALANDRA, T.; FELD, R.; PIZZO, P.A.; ROSLTON, K.V.I.; SHENEP, J.L.; YOUNG, L.S. Guidelines for a use of antimicrobial agents ins neutropenic patient with cancer – Infectious diseases society of America (IDSA). *Clin Infect Dis*. 34:70-51, 2002.
135. CRIGHTON, M.H. Dimendions of neutropenia in adult cancer patients. *Cancer Nursing*. 27(4): 275-84, 2004.
136. BASHAN, N.; HAGAI, Y.; POTASHMIK, R.; MOSES, S.W. Impaired carbohydrate metabolism of polymorphonuclear leucocytes in glycogen storage disease Ib. *Clin Invest*. 81:1317-22, 1988.
137. NUSSLE, D.; WYSS, M.; PEYER, R.; COX, J.; VONLANTHEN, A. Primary defect of granulocytes associated with Crohns disease. *Pediatr Res*. 17:425-426, 1983.
138. ROE, T.F.; THOMAS, D.W.; GILSANZ, V.; ISSAACS, H.; ATKINSON, J.B. Inflammatory bowel disease in glycogen storage disease type Ib. *J Pediatr*. 109:55-59, 1986.
139. COUPER, R.; KAPELUSHNIK, J.; GRIFFTHS, A.M. Neutrophil dysfunction in glycogen storage disease Ib: association with Crohn's – like colitis. *Gastroenterology*. 100:549-54, 1991.
140. ROE, T.F.; COATES, T.D.; THOMAS, D.W.; MILLER, J.H.; GILSANZ, V. Brief report: treatment of chronic inflammatory bowel disease in glycogen storage disease type Ib with colony-stimulating factors. *N Engl Med*. 326:1666-69, 1992.
141. SHANAHAN, F.; BERNSTEIN, C.N. Odd forms of inflammatory disease: what can they tell us? *Gastroenterology*. 104:327-29, 1993.
142. HARA, T.; MIZUNO, Y.; OKUBO, K.; UEDA, K. Glycogenosis type 1 b and periodontitis. *J Pediatr*. 111:952, 1987.
143. HARPER, P.S. *Practical Genetic Counselling*. 3 rd ed. Londres: Ed. Wrigt, 1988.

144. SMIT, G.P.A. The long-term outcome of patients with glycogen storage disease type Ia. *Eur J Pediatr.* 152:S52-S55, 1993.
145. FERNANDES, J.; HUIJING, F.; VAN DE KAMER, J.H. A screening method for liver glycogen diseases. *Arch Dis Child.* 44(235):311-7, 1969.
146. RAKE, J.P.; VISSER, G.; LABRUNE, P.; LEONARD, J.V.; ULLRICH, K.; SMIT, G.P. Guidelines for management of glycogen storage disease type I – European study on glycogen storage disease type I (ESGSD I). *Eur J Pediatr.* 161:S112-9, 2002.
147. GREENE, H.L.; SLONIM, A.E.; BURR, I.M. Type I glycogen storage disease: a metabolic basis for advances in treatment. *Adv Pediatr.* 26:63-92, 1979.
148. WOLFSDORF, J.I.; PLOTKIN, R.A.; LAFFEL, L.M.; CRIGLER, J.F. jr. Continuous glucose treatment of patients with type I glycogen-storage disease: comparison of the effects of dextrose and uncooked cornstarch on biochemical variables. *Am J Clin Nutr.* 52(6):1043-50, 1990.
149. GREENE, H.L.; SLONIM, A.E.; O'NEILL, J.A.; BURR, I.M. Continuous nocturnal intragastric feeding for the management of type I glycogen storage disease. *N Engl J Med*; 294:423-25, 1976.
150. CHEN, Y.T.; CORNBLATH, M.; SIDBURY, J.B. Cornstarch therapy in type I glycogen storage disease. *N Engl J Med.* 310:171-75, 1984.
151. BURCHELL, A.; WADDELL, I.D. The molecular basis of the genetic deficiencies of five the components of the glucose-6-phosphatase system: improved diagnosis. *Eur J Ped.* 152:S18-S21, 1993.
152. MAHONEY, D.H.; AMBRUSO, D.R.; McCABE, E.R.B.; ANDERSON D.C.; LEONARD, J.V.; DUNGER, D.B. lack of effect of lithium carbonate in patients with glycogenosis type Ib. *AJDC.* 141:985-6, 1987.
153. KOLETZKO, B.; WENDEL, U.; BREMER, H.J. Lithium for treatment of neutropenia in glycogen storage disease type IB. *Pediatr.* 109:902-4. 1986.
154. ZINGONE, A.; HIRAIWA, H; PAN, C.J.; LIN, B; CHEN, H.; WARD, J.M.; CHOU, J.Y. Correction of glycogen storage disease type Ia in a mouse model by gene therapy. *J. Biol. Chem.*, 275: 828-32, 2000.
155. VIDIGAL. P.G.; SILVA, A.P.G.B. Uma compilação sobre glicogenose tipo I. *Arq. Ciênc. Saúde Unipar, Umuarama*, v.12, n.2, p.157-164, 2008.
156. LYER, S.G.; CHEN, C.L.; WANG, C.C. et al. Long-term results of living donor liver transplantation for glycogen storage disorders in children. *Liver Transpl.* 13:848-52, 2007.
157. LABRUNE, P. Glycogen storage disease type I: indications for liver and/or kidney transplantation. *Eur J Pediatr.* 161:S53-5, 2002.

158. PIERRE, G.; CHAKUPURAKAL, G.; McKIERNAN, P.; HENDRIKSZ, C.; LAWSON, S.; CHAKRAPANI, A. Bone marrow transplantation in glycogen storage disease type Ib. 152:286-8, 2008.
159. DON, R.H.; COX, P.T.; WAINWRIGHT, B.J.; BAKER, K.; MATTICK, J.S. ‘Touchdown’ PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. Nucleic Acids Res. 19:4008, 1991.
160. SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Nat Acad Sci;74(12):5463-7, 1977.
161. Nussbaum RL, McInnes RR e Willard HF. Thompson e Thompson Genética Médica, 7a ed., Elsevier Editora LTda, Rio de Janeiro, 2008.
162. Kure S, Hou DC, Suzuki Y, Yamagishi A, Hiratsuka M, Fukuda T, et al. Glycogen storage disease type Ib without neutropenia. J Pediatr; 137:253-6, 2000.
163. Martens DH, Kuijpers TW, Maiani NA, Rake JP, Smit GP, Visser G. A patient with common glycogen storage disease type Ib mutations without neutropenia or neutrophil dysfunction. J Inher Metab Dis ;29:224-5, 2006.
164. Gitzelmann R, Bosshard NU. Defective neutrophil and monocyte functions in glycogen storage disease type Ib: A literature review. Eur J Pediatr 152(Suppl 1):S33–S38, 1993.
165. FERREIRA, A.M.C.; FERNANDES, M.I.M.; GALVÃO, L.C.; SAWAMURA, R.; GOLDANI, H.A.S.; OLIVEIRA, J.A.M. Glicogenose hepática na infância. Arq Gastroenterol. 32: 3:146-51, 1995.

8 – ANEXOS

8.1 Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa



FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html

CEP, 25/11/08.
(Grupo II)

PARECER CEP: Nº 845/2008 (Este nº deve ser citado nas correspondências referente a este projeto).
CAAE: 0672.0.146.000-08

I - IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: "DETERMINAÇÃO DE MUTAÇÕES QUE ALTERAM O SÍTIO DE SPLICING NOS GENES G6PC E G6PT1 EM PACIENTES COM GLICOGENOSE TIPO IA E IB, ATRAVÉS DA CONSTRUÇÃO DE MINIGENES".

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Carlos Eduardo Steiner

INSTITUIÇÃO: Departamento de Genética Médica/FCM/UNICAMP

APRESENTAÇÃO AO CEP: 10/10/2008

APRESENTAR RELATÓRIO EM: 25/11/09 (O formulário encontra-se no site acima)

II - OBJETIVOS

Determinar mutações em exons e introns no gene G6PC em indivíduos portadores de glicogenose tipo Ia, e no gene G6PT1 em portadores de glicogenólise tipo Ib e, por intermédio da construção de minigenes, analisar mutações que poderiam estar provocando alterações em sítio de splicing dos respectivos genes.

III - SUMÁRIO

Serão avaliados 10 pacientes com quadro clínico sugestivo de glicogenólise tipo Ia e Ib que se encontram em acompanhamento no HC/UNICAMP. Será utilizado o dHPLC para triagem de mutações. Para a procura de mutações intrônicas serão construídos mini-genes e analisados os RNAm expressos.

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

Projeto de Genética Humana que segue todas as resoluções específicas. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido adequado, inclusive com relação ao armazenamento de material biológico. O banco tem regimento aprovado pelo CEP.

V - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa, bem como ter aprovado o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa supracitada.

Comitê de Ética em Pesquisa - UNICAMP
Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126
Caixa Postal 6111
13084-971 Campinas - SP

FONE (019) 3521-8936
FAX (019) 3521-7187
cep@fcm.unicamp.br

- 1 -

8.2 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Departamento de Genética Médica

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do projeto: “*DETERMINAÇÃO DE MUTAÇÕES NOS GENES G6PC E G6PT1 EM PACIENTES COM GLICOGENOSE TIPO IA E IB*”.

OBJETIVO DA PESQUISA:

Eu entendo que fui convidado a participar em um projeto de pesquisa envolvendo indivíduos com Glicogenose tipo Ia e Ib. O objetivo geral do estudo é o de procurar mutações nos genes que causam essas doenças. O sigilo será mantido em todo o estudo através da utilização de um número de código para a identificação dos participantes.

PROCEDIMENTO:

Eu entendo que se concordar em participar desse estudo, os pesquisadores farão perguntas a respeito dos meus antecedentes médicos e familiares. Será colhida uma amostra de sangue venoso. Hospitalização não será necessária.

RISCO E DESCONFORTO:

Uma coleta de 30 mL de sangue venoso será efetuada. Os riscos associados a esse procedimento são mínimos, podendo ocorrer dor e manchas roxas (equimoses) no local da coleta do sangue. O desconforto será mínimo, pois se trata de uma coleta de sangue geralmente da veia do braço que será realizado por profissional treinado e devidamente habilitado para realizar esse procedimento.

VANTAGENS:

Eu entendo que não obterei nenhuma vantagem direta com a minha participação nesse estudo, a não ser o aconselhamento genético referente à minha doença. Fui informado que se for detectada alguma alteração gênica, serei imediatamente comunicado, sendo que todas as

consequências serão devidamente explicadas e meus parentes próximos, se assim desejarem, poderão realizar o exame. Qualquer dúvida ou informação poderá contatar a UNICAMP no tel. (019) 3521-8907 (Profº. Dr. Carlos Eduardo Steiner).

SIGILO:

Eu entendo que toda informação médica, assim como os resultados dos testes genéticos decorrentes desse projeto de pesquisa, serão submetidos aos regulamentos do HC-UNICAMP referentes ao sigilo da informação médica. Se os resultados ou informações fornecidas forem utilizados para fins de publicação científica, nenhum nome será utilizado.

FORNECIMENTO DE INFORMAÇÃO ADICIONAL:

Em caso de recurso, dúvidas ou reclamações poderei contatar a secretaria do Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Médicas-UNICAMP, tel. (019) 3521-8936.

RECUSA OU DESCONTINUAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO:

Eu entendo que a minha participação é voluntária e que eu posso me recusar a participar ou retirar meu consentimento e interromper a minha participação no estudo a qualquer momento (incluindo a retirada da amostra de sangue) sem comprometer os cuidados médicos que recebo atualmente ou receberei no futuro no HC-UNICAMP.

Eu confirmo que o (a) Dr. (a)_____ explicou-me o objetivo do estudo, os procedimentos aos quais serei submetido e os riscos ou desconfortos advindos desse projeto de pesquisa. Eu li e/ou me foi explicado, assim como compreendi esse formulário de consentimento e estou de pleno acordo em participar desse estudo.

Nome e RG participante (ou responsável)

Data

Assinatura do participante (ou responsável)

Data

Eu () concordo / () não concordo que as amostras de meu DNA ou do DNA do menor sob minha responsabilidade legal sejam armazenados para fins de pesquisas futuras, que deverão ser submetidas a nova aprovação por este Comitê de Ética em Pesquisa.

_____ Nome e RG participante (ou responsável)	_____ Data
_____ Assinatura do participante (ou responsável)	_____ Data

RESPONSABILIDADE DO PESQUISADOR:

Eu expliquei a _____ o objetivo do estudo, os procedimentos requeridos e os possíveis riscos que poderão advir do estudo, usando o melhor do meu conhecimento. Eu me comprometo a fornecer uma cópia desse formulário de consentimento ao participante ou responsável.

Nome e RG do pesquisador _____

_____ Assinatura do pesquisador	_____ Data
------------------------------------	---------------