



MARCELLA BERGAMINI DE BAPTISTA

**ANÁLISE DE MUTAÇÕES NO GENE *GLB1* EM PACIENTES COM
GANGLIOSIDOSE GM1 FORMAS JUVENIL E CRÔNICA**

**CAMPINAS
2013**



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS**

MARCELLA BERGAMINI DE BAPTISTA

**ANÁLISE DE MUTAÇÕES NO GENE *GLB1* EM PACIENTES COM
GANGLIOSIDOSE GM1 FORMAS JUVENIL E CRÔNICA**

Orientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo Steiner

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

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA ALUNA MARCELLA BERGAMINI DE BAPTISTA E ORIENTADO PELO PROF. DR. CARLOS EDUARDO STEINER

Assinatura do Orientador

**CAMPINAS
2013**

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

B229a Baptista, Marcella Bergamini de, 1988-
 Análise de mutações no gene *GLB1* em pacientes com gangliosidose GM1
 formas juvenil e crônica / Marcella Bergamini de Baptista. – Campinas, SP : [s.n.],
 2013.

 Orientador: Carlos Eduardo Steiner.
 Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de
 Ciências Médicas.

 1. Gangliosidose GM1. 2. Sequenciamento de DNA. I. Steiner, Carlos
 Eduardo, 1969-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências
 Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Mutation analysis in *GLB1* gene in patients with GM1 gangliosidosis,
juvenile and chronic types

Palavras-chave em inglês:

GM1 gangliosidosis

DNA sequencing

Área de concentração: Ciências Biomédicas

Titulação: Mestra em Ciências Médicas

Banca examinadora:

Carlos Eduardo Steiner [Orientador]

Ursula da Silveira Matte

Carmen Silvia Bertuzzo

Data de defesa: 30-07-2013

Programa de Pós-Graduação: Ciências Médicas

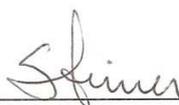
BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

MARCELLA BERGAMINI DE BAPTISTA

Orientador (a) PROF(A). DR(A). CARLOS EDUARDO STEINER

MEMBROS:

1. PROF(A). DR(A). CARLOS EDUARDO STEINER



2. PROF(A). DR(A). URSULA DA SILVEIRA MATTE



3. PROF(A). DR(A). CARMEN SILVIA BERTUZZO



Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas
da Universidade Estadual de Campinas

Data: 30 de julho de 2013

Dedicatória

Aos meus pais, Elza Bergamini e Tarciso Francisco de Baptista, que sempre me levaram por todos os caminhos que percorri na vida e sempre estavam por perto quando eu olhei para trás, que me deram a vida e me ensinaram a vivê-la com dignidade, que iluminaram os caminhos obscuros com afeto e dedicação, que se doaram inteiros e renunciaram aos seus sonhos, para que eu pudesse realizar o meu e a quem dedicarei todas as minhas conquistas.

A todos que acreditaram em mim e aceitaram participar desse projeto, que serão sempre parte da minha história e fundamentais na minha vida.

Agradecimentos

A **Deus** por ouvir minhas preces e muitas vezes atender meus pedidos.

Aos meus pais, **Elza Bergamini** e **Tarciso Francisco de Baptista**, por serem excelentes exemplos.

Ao **Prof. Dr. Carlos Eduardo Steiner**, por orientar cada passo dessa trajetória. Nesses anos que convivemos me ensinou a ser mestre e a fazer as melhores escolhas. Desenvolvi uma admiração imensa por seus valores e caráter. Muito obrigada por dividir seu conhecimento comigo, é um privilégio ser sua aluna.

As **Profa. Dra. Carmen Silvia Bertuzzo** e **Profa. Dra. Ursula da Silveira Matte**, por participarem da minha defesa de metrado e contribuírem para a finalização desse trabalho.

Aos meus irmãos, **Fernanda Bergamini de Baptista** e **Leandro Francisco Bergamini de Baptista**, por toda a força e amor que me deram a vida inteira. Ser a irmã mais nova de vocês é muita responsabilidade, mas não consigo imaginar irmãos melhores.

A **Rita de Cássia Rosa de Baptista**, por ser mais que uma amiga e mais que uma simples cunhada, por ser uma irmã também.

A **Giovanna Rosa de Baptista**, por me acalmar nos momentos mais difíceis.

Aos meus tios **Mirian Lúcia Bergamini Gomes** e **Edison Luiz Magueta Gomes**, a presença constante me faz enxergar vocês como meus segundos pais.

A **Maria de Lourdes Bergamini** (*in memoriam*) e **Olyntho Bergamini** (*in memoriam*), por cuidarem de mim e visitarem meus sonhos.

A **Benjamin Fisher** (*in memoriam*), por hoje ser minha estrela guia.

A **Juliana Cantarino Merino**, por ser minha caixinha de segredos, meu porto seguro e por ser a irmã que a vida me deu a oportunidade de escolher. E a **família Merino** por sempre me considerarem parte de família.

Às **famílias Battagin e Laranjeira** por me acolherem com tanto carinho, cuidarem de mim, por me aceitarem do jeito que sou e terem sempre muita paciência com a minha personalidade forte. Tenho muito orgulho de conviver e de futuramente pertencer a essa família.

A **Karina da Costa Silveira**, nunca existirão palavras para te agradecer e nunca saberei por onde começar a ser grata por tudo o que você já fez por mim. Agradeço a Deus todos os dias por ter você na minha vida.

A **Thatiane Yoshie Kanazawa**, por ser meu contrário e me ensinar a amar o diferente. Nossas diferenças me ensinaram o que é amizade verdadeira. Sem você nem um passo de todo esse caminho teria graça.

A **Fernanda Christina Reis Pinto, Alexandre Hilário Berenguer de Matos e Daniel Zanetti Scherrer** por estarem sempre presentes com os melhores conselhos, eu não conseguiria sem vocês.

A **Luciana Cardoso Bonadia**, por me guiar por todo o caminho, desde o mais simples procedimento até a conclusão desse trabalho. Por ser um exemplo, por abrir as portas do meu futuro e por estar sempre ao meu lado.

A todas as pessoas que fazem do Laboratório da Genética Molecular da Faculdade de Ciências Médicas o melhor lugar do mundo para trabalhar. Tenho muito orgulho de fazer parte dessa equipe tão competente.

A **André Silva Battagin**, sua força, sua paciência e seu amor me fazem melhor a cada dia. Sem você eu teria desistido na primeira tempestade. Ter você ao meu lado me faz corajosa para enfrentar qualquer coisa. Muito obrigada por me amar e me fazer amar, por me fazer sorrir, por toda a paciência que tem comigo e por cada minuto que passei com você nesses três anos que estamos juntos.

*“Liberte seu coração e deixe que ele
construa o seu futuro.”*

Roberto Shinyashiki

Sumário

Resumo	xi
Abstract	xii
Lista de abreviaturas	xiii
Lista de tabelas e quadro	xiv
Lista de figuras	xv
1. Introdução	16
1.1. Erros Inatos do Metabolismo.....	17
1.2. Doenças lisossômicas de depósito.....	18
1.3. Gangliosidose GM1.....	20
1.3.1. Forma infantil.....	21
1.3.2. Forma juvenil.....	21
1.3.3. Forma crônica.....	22
1.4. Doença de Morquio B (Mucopolissacaridose tipo IV B).....	23
1.5. Gangliosídeo GM1.....	24
1.6. Enzima β -galactosidase.....	26
1.7. Gene <i>GLB1</i>	27
1.8. <i>Elastin binding protein</i>	28
1.9. Relação genótipo-fenótipo.....	29
2. Objetivos	30
2.1. Objetivo Geral	31
2.2. Objetivo Específico	31
3. Casuística e Métodos	32
3.1. Aspectos éticos da pesquisa.....	33
3.2. Características da população.....	34
3.2.1. Critérios de inclusão.....	34
3.2.2. Critérios de exclusão.....	35
3.3. Estratégia de estudo.....	35
3.4. Procedimentos.....	36
3.4.1. Extração de DNA.....	36
3.4.2. Desenho de <i>primers</i>	37
3.4.3. Reação em Cadeia da Polimerase.....	39
3.4.4. Reação com Exo-sap.....	40

3.4.5. Sequenciamento por eletroforese capilar.....	41
3.4.6. Análise <i>in silico</i> das alterações inéditas.....	42
3.4.7. Análise com enzima de restrição.....	43
3.4.8. Clonagem gênica.....	45
3.4.8.1. Ligaçãõ.....	45
3.4.8.2. Transformaçãõ.....	46
3.4.8.3. Extraçãõ de DNA plasmidial (mini-prep).....	46
4. Resultados.....	48
4.1. Mutaçãõ p.R59H.....	51
4.2. Mutaçãõ p.F107L.....	52
4.3. Alteraçãõ neutra p.P152P.....	53
4.4. Mutaçãõ p.L173P.....	54
4.5. Mutaçãõ p.R201H.....	55
4.6. Mutaçãõ p.G311R.....	56
4.7. Alteraçãõ inédita p.I354S.....	57
4.8. Alteraçãõ inédita p.T384S.....	58
4.9. Polimorfismo IVS12+8T>C.....	59
4.10. Mutaçãõ p.T500A.....	60
4.11. Inserçãõ c.1717-1722insG.....	61
4.12. Análise <i>in silico</i>	62
4.13. Digestãõ com enzima <i>Hinf I</i>	63
4.14. Clonagem.....	64
5. Discussãõ.....	66
5.1. Mutaçãõ p.R59H.....	67
5.2. Mutaçãõ p.F107L.....	68
5.3. Alteraçãõ neutra p.P152P.....	69
5.4. Mutaçãõ p.L173P.....	70
5.5. Mutaçãõ p.R201H.....	71
5.6. Mutaçãõ p.G311R.....	72
5.7. Alteraçãõ inédita p.I354S.....	73
5.8. Alteraçãõ inédita p.T384S.....	73
5.9. Polimorfismo IVS12+8T>C.....	74
5.10. Mutaçãõ p.T500A.....	74

5.11. Inserção c.1717-1722insG.....	77
6. Conclusões.....	78
7. Referências.....	81
8. Anexo.....	90
9. Apêndice.....	93

Resumo

Gangliosidose GM1 é uma doença autossômica recessiva rara, classificada em três formas clínicas de acordo com a idade de apresentação dos sintomas e a gravidade, provocada pela deficiência da enzima lisossômica β -galactosidase que leva ao acúmulo, principalmente, do gangliosídeo GM1. A forma juvenil geralmente apresenta início entre sete meses e três anos de idade, com progressão lenta dos sinais neurológicos, dimorfismos menos graves que na forma infantil e deformidades ósseas. A forma crônica é caracterizada por apresentações clínicas mais leves e sintomas extrapiramidais. O gene codificador da enzima é o *GLB1*, no qual mais de 130 mutações foram descritas.

No presente estudo foi realizada a caracterização molecular de 10 indivíduos de nove famílias não relacionadas diagnosticados com gangliosidose GM1, nas formas juvenil e crônica. Todas as famílias são originárias do interior do estado de São Paulo ou do sul do estado de Minas Gerais.

Para a análise realizada foi possível identificar a mutação anteriormente descrita p.T500A, em sete das nove famílias estudadas, a inserção c.1717-1722insG e a mutação p.R59H foram encontradas em duas famílias (a última segregou juntamente com o polimorfismo descrito IVS12+8T>C). As demais mutações descritas (p.F107L, p.L173P, p.R201H, p.G311R) foram encontradas em uma família cada. Uma alteração neutra (p.P152P) e duas mutações (p.I354S e p.T384S) são inéditas. Foi possível identificar a ocorrência de uma mutação *de novo* em uma família. Todas as mutações foram encontradas em heterozigose.

Abstract

GM1 gangliosidosis is a rare autosomal recessive, classified in three clinical types according to age of onset and severity. The disease is caused by the deficiency of lysosomal enzyme β -galactosidase that leads to the accumulation of GM1 ganglioside. The juvenile form usually shows an onset between seven months and three years of age, with slowly progressive neurological signs, less severe dysmorphisms than the infantile form and skeletal changes. The adult form is specified by a milder clinical manifestations and extrapyramidal signs. The lysosomal enzyme is coded by the *GLB1* gene which more than 130 mutations have been described.

In the present study it was genotyped 10 individuals of nine unrelated families originated from the States of São Paulo and Minas Gerais diagnosed with the juvenile and chronic forms of the disease.

It was possible to find the previously described mutations p.T500A in seven of the nine families, c.1717-1722insG and p.R59H in two alleles (the latter also segregating with IVS12+8T>C), and p.F107L, p.L173P, p.R201H, and p.G311R in one family each. One neutral alteration (p.P152P) and two mutations (p.I354S and p.T384S) are described for the first time. The occurrence of a *de novo* mutation was seen in one family. All patients presented as heterozygous compound.

Lista de abreviaturas

β -gal: Enzima β -galactosidase

BSA: *Bovine serum albumin*

CEP: Comitê de ética em pesquisa

DNA: *Desoxiribonucleic acid* (ácido desoxirribonucleico)

dNTP: *Deoxynucleoside triphosphates* (deoxinucleotídeo trifosfato)

EBP: *Elastin binding protein* (proteína ligadora de elastina)

EDTA: *Ethylenediaminetetraacetic acid* (ácido etilendiamino tetraacético)

EIM: Erros inatos do metabolismo

GALNS: N-acetilgalactosamina-6-sulfato sulfatase

GLB1: Gene da β -galactosidase 1

HGMD: *Humam Gene Mutation Database*

NEU1: Neuraminidase

pb: Pares de base

PCR: *Polymerase chain reaction* (Reação em cadeia da polimerase)

PPCA: Proteína protetora/catepsina A

RNA: *Ribonucleic acid* (ácido ribonucleico)

RNA_m: RNA mensageiro

RSB: *Reaction stop buffer* (tampão de parada de reação)

Taq: *Thermus aquaticus*

Lista de tabelas e quadro

Tabela 1. Principais características das formas clínicas de gangliosidose GM1.....	23
Tabela 2. <i>Primers</i> utilizados nas reações de PCR e sequenciamento.....	38
Tabela 3. Lista de algoritmos e endereço eletrônico.....	43
Tabela 4. Dosagem enzimática, aspectos clínicos e mutações encontradas.....	50
Tabela 5. Resultados análise <i>in silico</i> das novas alterações encontradas.....	62
Quadro 1. Resultados comparação dos algoritmo para análise <i>in silico</i>	63

Lista de figuras

Figura 1. Via metabólica hipotética.....	17
Figura 2. Estrutura química do gangliosídeo GM1.....	25
Figura 3. Hidrólise do terminal β -galactosil do gangliosídeo GM1 pela β -galactosidase.....	27
Figura 4. Localização das mutações no gene <i>GLB1</i>	28
Figura 5. Condições utilizadas na PCR.....	39
Figura 6. Condições utilizadas na PCR <i>touchdown</i>	40
Figura 7. Condições utilizadas na reação de sequenciamento.....	41
Figura 8. Sítio de restrição para a enzima <i>Hinf I</i>	44
Figura 9. Fragmentos formados pela digestão com a enzima <i>Hinf I</i> no éxon 15.....	45
Figura 10. Amplificação dos 16 éxons do gene <i>GLB1</i> por PCR.....	49
Figura 11. Eletroferograma do fragmento que contém o éxon 2.....	51
Figura 12. Eletroferograma do fragmento que contém o éxon 3.....	52
Figura 13. Eletroferograma do fragmento que contém o éxon 4.....	53
Figura 14. Eletroferograma do fragmento que contém o éxon 5.....	54
Figura 15. Eletroferograma do fragmento que contém o éxon 6.....	55
Figura 16. Eletroferograma do fragmento que contém o éxon 9.....	56
Figura 17. Eletroferograma do fragmento que contém o éxon 10.....	57
Figura 18. Eletroferograma do fragmento que contém o éxon 12.....	58
Figura 19. Eletroferograma do fragmento que contém o éxon 12.....	59
Figura 20. Eletroferograma do fragmento que contém o éxon 15.....	60
Figura 21. Eletroferograma do fragmento que contém o éxon 15.....	61
Figura 22. Eletroforese em gel de agarose mostrando a digestão enzimática da mutação p.T500A.....	64
Figura 23. Eletroferograma mostrando o alelo normal do paciente da família 5.....	65
Figura 24. Eletroferograma mostrando o alelo mutante do paciente da família 5.....	65



1. Introdução

1.1 Erros Inatos do Metabolismo

Os Erros Inatos do Metabolismo (EIM) formam um grupo heterogêneo de doenças originadas a partir de uma alteração em genes que controlam processos bioquímicos em uma via metabólica conhecida do organismo, podendo levar à falha de síntese, degradação, armazenamento ou transporte de moléculas (1, 2).

São doenças monogênicas, sendo que a maioria apresenta herança autossômica recessiva. A alteração em um gene produz um defeito enzimático e provoca as alterações bioquímicas características de cada doença. Esse defeito enzimático pode ser a ausência de um produto esperado, acúmulo de substrato da etapa anterior à interrompida ou o surgimento de uma rota metabólica alternativa (figura 1) (2).

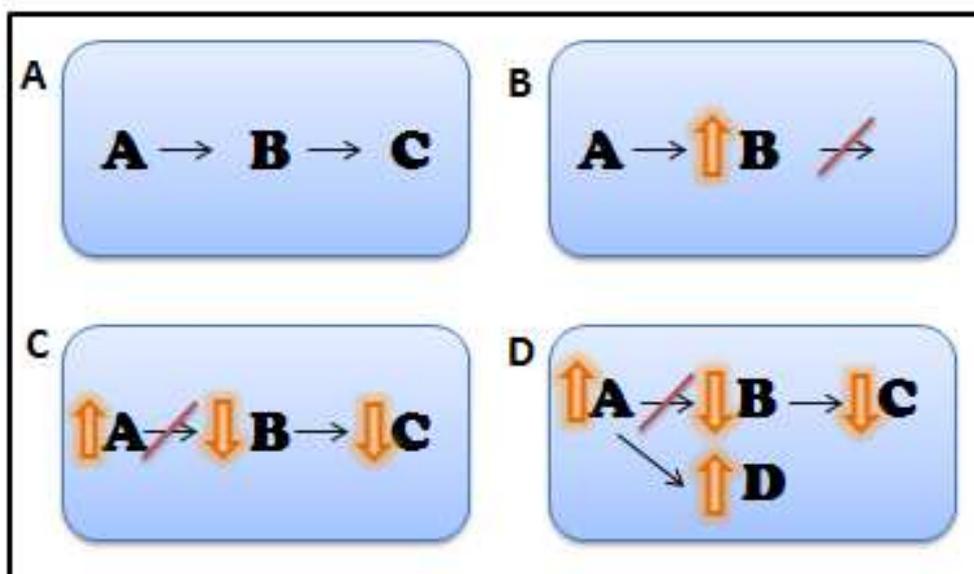


Figura 1. **A)** Vía metabólica hipotética normal. **B)** Defeito enzimático ocasionando ausência de um produto esperado. **C)** Acúmulo de substrato e(ou) deficiência dos produtos intermediários e finais. **D)** Surgimento de rota metabólica secundária, geralmente resultando em produtos alternativos tóxicos.

A maioria dos EIM se manifesta na faixa etária pediátrica, mas podem manifestar-se em qualquer faixa etária (1, 2, 3). A incidência isolada de cada uma das doenças metabólicas é pequena, porém em conjunto a frequência dos distúrbios se torna mais expressiva (1, 3).

Tratando-se de alterações distintas, os EIM têm diversas classificações. Nesse trabalho será utilizada a de Saudubray e Charpentier (4), que as dividiram em três grupos de acordo com suas características fisiopatológicas e fenótipo clínico. São eles:

- Grupo I: Distúrbios de síntese ou catabolismo de moléculas complexas.
- Grupo II: erros inatos do metabolismo intermediário.
- Grupo III: Deficiência na produção ou utilização de energia

Entre os distúrbios de síntese ou catabolismo de moléculas complexas estão as doenças lisossômicas de depósito como as gangliosidoses.

1.2 Doenças lisossômicas de depósito

Os lisossomos são organelas citoplasmáticas com a função de degradar partículas do meio extracelular e a reciclagem de outras organelas, contendo uma série de enzimas hidrolíticas envolvidas na degradação de uma variedade de macromoléculas. Defeitos genéticos nessas hidrolases têm como consequência o acúmulo intralisossômico de compostos não metabolizados, como mucopolissacarídeos, esfingolipídeos e glicoproteínas (5). O acúmulo desses compostos leva ao aumento da massa dos tecidos e órgãos acometidos. Quando ocorre no cérebro, esse depósito provoca neurodegeneração (5, 6).

As alterações genéticas podem levar a uma doença lisossômica por uma série de fatores, como:

- Ausência de síntese de precursor e enzima,
- Precursor e enzima sintetizados em uma taxa reduzida,
- Alteração do precursor da forma madura da enzima,
- Degradação da enzima devido à ausência da proteína protetora,
- Ausência de um fator necessário para a atividade enzimática,
- Inibição de atividade enzimática provocada por resíduos resultantes da deficiência de outra enzima (7, 8).

Para o diagnóstico realiza-se a medida da atividade enzimática e a investigação do acúmulo de compostos não degradados nos tecidos, sangue e urina (5).

Neste grupo de doenças encontra-se a deficiência hereditária da enzima lisossômica β -galactosidase (β -gal), expressa clinicamente em três diferentes doenças: gangliosidose GM1, doença de Morquio B e Galactosialidose. Enquanto a gangliosidose GM1 é uma doença neurodegenerativa com envolvimento visceral, a doença de Morquio B era descrita tradicionalmente como uma displasia esquelética sem envolvimento do sistema nervoso central. A galactosialidose é caracterizada pela deficiência secundária de β -gal e de neuraminidase devido a um defeito na proteína protetora/catepsina A (PPCA) que confere estabilidade a enzima madura (9, 10, 11).

A gangliosidose GM1 e a doença de Morquio são provocadas por alterações

no mesmo gene, o *GLB1*, codificador da enzima β -gal e da proteína ligadora de elastina (EBP) (11).

1.3 Gangliosidose GM1

A gangliosidose GM1 é uma doença rara, autossômica recessiva, provocada pela deficiência da enzima lisossômica β -gal (10, 12). Sua incidência está estimada em 1:100.000 a 200.000 nascidos vivos (11), porém existe uma maior incidência no Brasil (1:14.000), na Itália (1:10.000) e nas Ilhas de Malta (1:3.700) (7, 10, 11, 13, 14).

A diminuição da atividade da enzima β -gal provoca um acúmulo de gangliosídeos GM1 e GA1 nos lisossomos, principalmente nas células nervosas. Os glicosaminoglicanos e glicopeptídeos acumulam-se nas vísceras e em outros tecidos (15, 16) enquanto o sulfato de queratina deposita-se principalmente na cartilagem (17).

A doença, geralmente, é diagnosticada na infância devido ao atraso no desenvolvimento do sistema neuropsicomotor, mas a idade de início é variável. Os casos de início tardio são descritos como forma juvenil ou tipo 2 e forma adulta/crônica ou tipo 3 (18). Em casos que apresentam início tardio, o desenvolvimento inicial é normal e os sinais da degeneração do sistema nervoso central aparecem de maneira gradual. Portanto, a gangliosidose GM1 é classificada em três formas clínicas de acordo com a idade de manifestação dos primeiros sintomas, atividade enzimática residual e gravidade do quadro clínico (15). Existe uma relação clara entre a gravidade de cada tipo e a atividade

residual da enzima β -gal (11), sendo que pelo menos 50% da atividade enzimática garante um fenótipo normal (6).

1.3.1 Forma infantil

Chamada tipo I ou forma infantil (MIM# 230500), com início das manifestações clínicas entre o nascimento e seis meses, é uma forma rápida e progressiva (19). O paciente apresenta hipotonia muscular em fases iniciais que gradualmente mudam para rigoespasticidade associada a crises convulsivas. Manchas vermelho cereja na mácula assim como a hepatoesplenomegalia estão presentes em quase todos os casos (19, 20, 21).

Em casos típicos são evidentes os sinais dismórficos e a displasia esquelética generalizada, assim como a cardiomiopatia e a degeneração do sistema nervoso central (11, 18, 19).

O paciente torna-se vegetativo com rigoespasticidade generalizada e, geralmente, morre entre um e dois anos de idade (11, 18).

A atividade da enzima β -gal em cultura de fibroblastos é muito reduzida, sendo menor que 1% (13).

1.3.2 Forma juvenil

O tipo II ou forma juvenil (MIM# 230600) apresenta os primeiros sintomas entre sete meses e três anos, com progressão lenta (20).

As características principais são o atraso no desenvolvimento do sistema motor e cognitivo (11), lipidose neuronal (22), sendo que os dismorfismos esqueléticos

são menos graves que na forma infantil e a visceromegalia e as manchas vermelho cereja na mácula não são frequentes (12, 11, 23).

Problemas locomotores iniciais podem ser seguidos de estrabismo, fraqueza muscular, letargia e broncopneumonia (23). A atividade residual da enzima está entre 0,3 a 4,8% (10).

1.3.3 Forma crônica

Também denominada tipo III, forma adulta ou crônica (MIM# 230650), tem início tardio (entre três e 30 anos) e é caracterizada por sinais clínicos mais brandos (23, 16) como disfunção cerebelar, distonia, baixa estatura, deformidades vertebrais leves (23), sintomas extrapiramidais (disartria, disfagia, face sem expressão, tremores nas mãos e rigidez de braços e pernas), deposição progressiva de glicoesfingolipídeos nos núcleos da base e alteração de substância branca (11, 23), bem como atividade enzimática próxima a 9% da atividade normal (10).

O resumo das principais características clínicas é apresentado na tabela 1.

Tabela 1. Principais características das formas clínicas de gangliosidose GM1.

Características	Forma infantil	Forma juvenil	Forma crônica
Início	0-6 meses	7 meses – 3 anos	3 – 30 anos
Comprometimento cognitivo	+++	++	+
Manchas vermelho cereja	+	+ ou -	-
Hepatoesplenomegalia	+	+ ou -	-
Dismorfismo	+ ou -	+ ou -	-
Displasia esquelética	Generalizada	Generalizada	Localizada
Acúmulo de gangliosideo GM1	+++	++	+
Atividade β-galactosidase	<1%	0,3 – 4,8%	~9%

Legenda: (+++) maior gravidade; (++) gravidade média; (+) forma mais leve do sintoma; (-) ausência da característica.

1.4 Doença de Morquio B (Mucopolissacaridose tipo IV B)

A doença de Morquio B tem herança autossômica recessiva e é caracterizada por disostose múltipla com alterações ósseas típicas, retardo no crescimento, opacificação de córneas, dano na função cardíaca e, diferente da gangliosidose GM1, é descrita tradicionalmente como não apresentando comprometimento cognitivo. Esses sintomas aparecem devido ao acúmulo de sulfato de queratina e oligossacarídeos nos ossos, cartilagens e córnea. Geralmente os pacientes excretam grande quantidade desses produtos na urina (13, 17, 22).

Pacientes descritos previamente na literatura (11, 24) com atraso no desenvolvimento cognitivo indicativos de gangliosidose GM1 e anormalidades esqueléticas de Morquio B apresentaram sulfato de queratina e oligossacarídeos na urina, dificultando a diferenciação entre as duas doenças. Evidenciando essa situação, Hofer et al. (2010) (25) descreveram um paciente que apresenta as mutações p.R201H e S149F no gene *GLB1*. Esse paciente apresentou sintomas típicos de Morquio B aos 19 anos, tais como os valores elevados de sulfato de queratina e oligossacarídeos na urina. Esse indivíduo, porém, também apresentou envolvimento neurológico algum tempo depois, passando a apresentar a forma clínica de gangliosidose GM1 crônica.

Atualmente, há controvérsias na literatura se a condição clínica rotulada como “Morquio B” representa uma entidade específica, uma vez que tem se observado que tais indivíduos evoluem para os demais sinais e sintomas da gangliosidose GM1 nas formas tardias (25).

1.5 Gangliosídeo GM1

Gangliosídeo GM1 é um glicosíngolípídeo composto por uma molécula de ácido siálico (ácido N-acetilneuramínico) unida a quatro oligossacarídeos neutros (duas galactoses, uma N-acetilgalactosamina e uma glicose) através de ligação α -glicosídica (figura 2) (26).

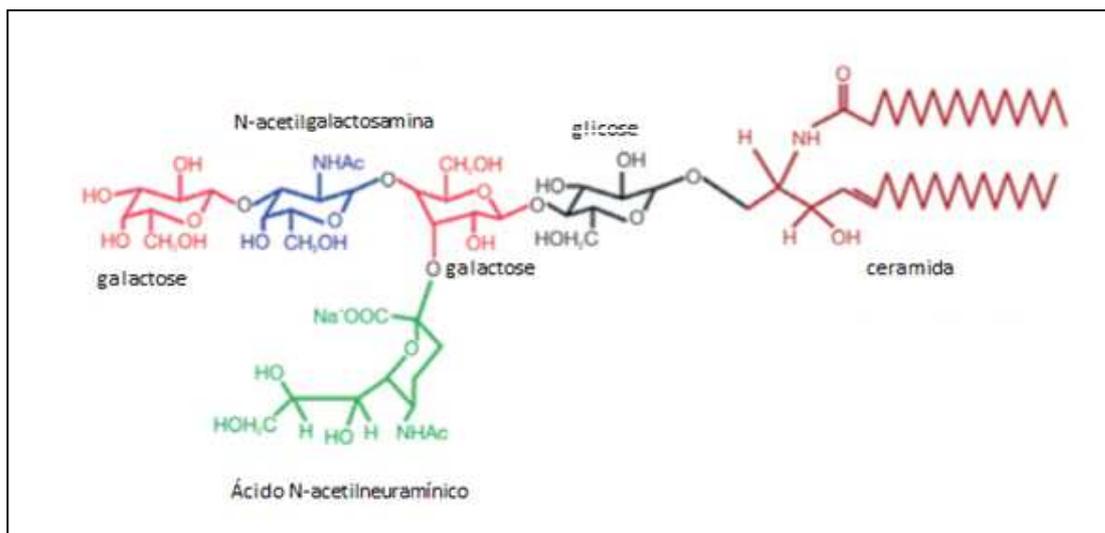


Figura 2. Estrutura química do gangliosídeo GM1. Adaptado de Mochetti, 2005.

Esse gangliosídeo está ligado à membrana celular em todos os tecidos dos vertebrados (27), localizando-se principalmente no sistema nervoso. Embora esteja distribuído por toda a superfície neuronal, existe uma maior concentração na região sináptica (28, 29).

Muitos estudos (26, 27, 29) sugerem a participação desse gangliosídeo no desenvolvimento neuronal, na sinaptogênese e na transmissão sináptica, podendo funcionar como receptor, interagindo com outras células, com a matriz extracelular ou com substâncias exógenas. O gangliosídeo GM1 pode, também, ter a função de modulador de proteínas funcionais de membrana, como, por exemplo, fatores tróficos e transportadores.

O crescimento e a maturação do sistema nervoso central parecem ser influenciados por todos os gangliosídeos, uma vez que sua concentração e

localização sofrem importantes mudanças durante o desenvolvimento cerebral (29). Além disso, de forma individual, essas moléculas podem ser usadas como marcadoras dos estágios de diferenciação celular, sendo o gangliosídeo GM1 e o GM4 relacionados com a mielinização (30).

A biossíntese do GM1 é realizada por transferases ligadas a membrana. Este gangliosídeo é transportado da membrana para o lisossomo, onde é degradado de maneira gradual pela hidrolase ácida β -galactosidase. Mutações no gene codificador da hidrolase resultam na sua deficiência e conseqüentemente no acúmulo intralisossômico de gangliosídeo GM1 (18).

1.6 Enzima β -galactosidase

A β -gal é codificada como uma enzima precursora de 76 kDa, que é primeiramente modificada na forma glicosilada de 85 kDa e processada na forma madura de 64kDA dentro dos lisossomos (31). A maturação da precursora da β -gal exige a associação com a proteína protetora/catepsina A (PPCA) (16). Quando ativada, a enzima madura forma um complexo de alto peso molecular com a PPCA, a neuraminidase (NEU1) e a N-acetil galactosamina-6-sulfato (GALNS) nos lisossomos (15, 32). Nesse caso a PPCA é essencial para o transporte intracelular e para a estabilidade intralisossômica da β -gal e NEU1 (10, 15). O complexo enzimático realiza a degradação de gangliosídeos GM1 (Figura 3) e GA1, glicosfingolípídeos, glicosaminoglicanos (queratan sulfato), glicopeptídeos e esfingolípídeos dentro dos lisossomos (10).

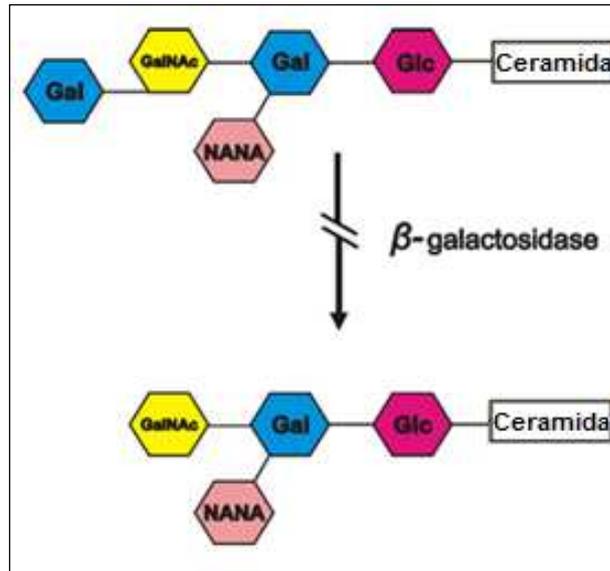


Figura 3. Hidrólise do terminal β -galactosil do gangliosídeo GM1 pela β -galactosidase. Gal: galactose, GalNAc: N-acetilgalactosamina, Glc: glicose, NANA: ácido N-acetilneuramínico.

Adaptado de Brunetti-Pierre, 2008.

A degradação enzimática do sulfato de queratina e do gangliosídeo GM1, o principal glicoesfingolípídeo das membranas neuronais, é a função mais importante da enzima β -gal (18).

1.7 Gene *GLB1*

O gene codificador da enzima β -gal é o *GLB1*, mapeado no braço curto do cromossomo 3 (3p21.33) com 16 éxons (23), abrangendo cerca de 62,5 kb. Esse gene origina dois RNAs mensageiros, um com 2,5 kb que codifica a enzima lisossômica e outro com 2,0 kb que codifica a EBP (16).

Em revisão da literatura especializada, foram descritas mais de 130 mutações no gene *GLB1* (33), sendo a maioria *missense/nonsense*, seguidas por mutações

em sítios de *splicing*, enquanto as menos frequentes são as inserções e deleções (13, 34).

A localização das mutações *missense/nonsense* principalmente nos exons 2, 6 e 15 (Figura 4) sugere possíveis funções catalíticas ou regulatórias nas porções proteicas codificadas por essas regiões (11).

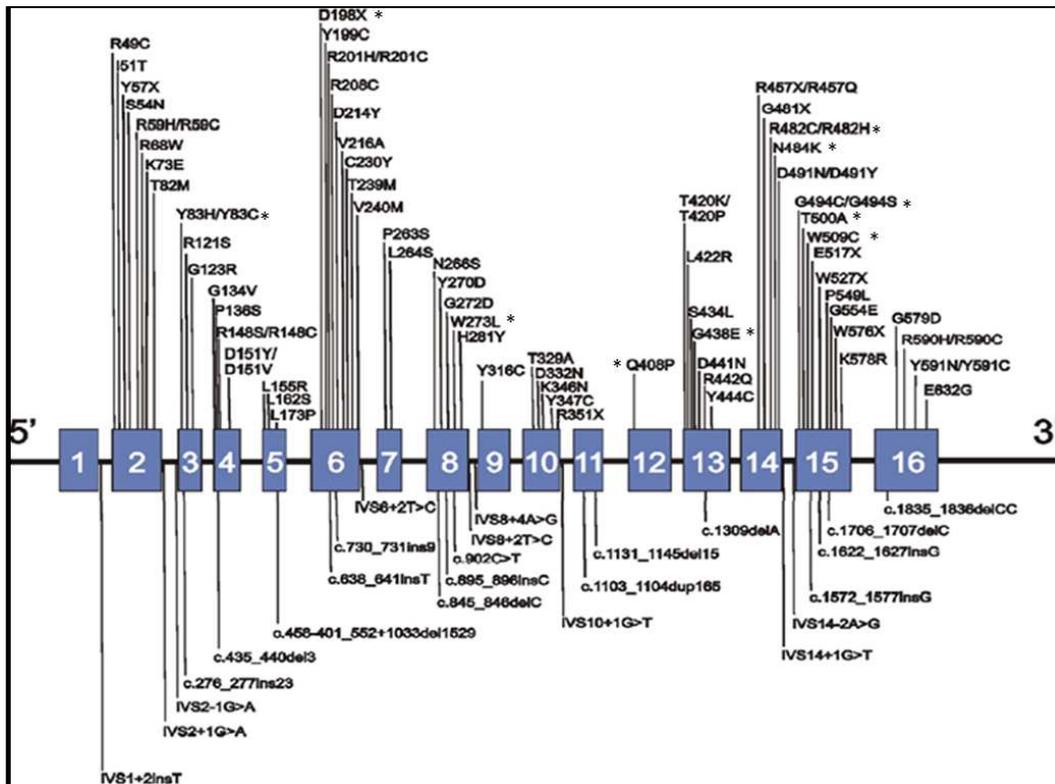


Figura 4. Localização das mutações no gene *GLB1*. Adaptado de Brunetti-Pierre, 2008.

* Mutações associadas à doença de Morquio B.

1.8 Elastin Binding Protein

O outro transcrito do gene *GLB1*, responsável pela produção da EBP, não contém a sequência nucleotídica relativa aos éxons 3, 4 e 6, bem como parte do 5. Os 32 códons conservados do éxon 5 são responsáveis pela porção protéica

relacionada à ligação entre o transcrito formado e a tropoelastina nas fibras elásticas da superfície celular (11, 16).

A EBP é necessária na formação de monômeros de tropoelastina em fibras elásticas na superfície celular, onde forma um complexo com PPCA e NEU1. Neste complexo, PPCA age como uma proteína protetora sem função enzimática, enquanto NEU1 permite a ligação do complexo nas membranas (15).

Quando afetada, a EBP contribui com características específicas dos pacientes com gangliosidose GM1, como a cardiomiopatia e defeitos no tecido conjuntivo (11).

1.9 Relação genótipo-fenótipo

O conhecimento sobre os efeitos das alterações na função e biossíntese da proteína β -gal ainda é limitado (13), dificultando uma clara relação genótipo-fenótipo. Outro fator que dificulta o esclarecimento dessa relação é a heterogeneidade molecular, porque enquanto um caso prévio de um paciente homocigoto para a mutação p.R201H sem envolvimento neurológico foi classificado com doença de Morquio B, outros heterocigotos com essa mutação foram associados com a forma juvenil ou adulta da gangliosidose GM1 (13).



2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

Realizar a caracterização molecular dos pacientes diagnosticados com gangliosidose GM1, nas formas juvenil e crônica, atendidos no Ambulatório de Erros Inatos do Hospital das Clínicas da Universidade Estadual de Campinas – Unicamp.

2.2 Objetivo específico

Rastrear mutações através da técnica de sequenciamento.



3. Casuística e Métodos

Trata-se de um estudo descritivo em uma amostra de indivíduos afetados por uma condição rara. Os sujeitos de pesquisa foram oriundos do ambulatório de Erros Inatos do Metabolismo do Serviço de Genética Clínica do Departamento de genética médica da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp) e os experimentos foram realizados no Laboratório de Genética Molecular na Faculdade de Ciências Médicas/Unicamp.

3. 1 Aspectos éticos da pesquisa

O presente projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Ciências Médicas/Unicamp sobre o número 236/2011 (anexo) e a partir de então os pacientes foram contatados pela equipe de pesquisadores para serem informados sobre o estudo. Aos sujeitos e seus responsáveis legais foi apresentado um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (apêndice), em duas vias, que assegura o direito de desligar-se da pesquisa e retirada do consentimento em qualquer de suas etapas, sem prejuízos ao seu atendimento no Ambulatório de Erros Inatos do Metabolismo.

Os resultados dos exames e suas implicações para fins de aconselhamento genético foram transmitidos aos médicos responsáveis pelos pacientes e seus familiares. O aconselhamento genético foi conduzido por profissional habilitado e capacitado para tal (geneticista clínico), que é também o médico responsável pelos pacientes.

Também foram garantidas a confidencialidade, a privacidade e a proteção da imagem dos voluntários e de suas informações confidenciais. O material

biológico e os dados obtidos na pesquisa foram exclusivamente usados para este projeto, sendo oferecida a possibilidade de armazenamento por cinco anos para eventual realização de outros exames adicionais, após aprovação pelo CEP ou por novo consentimento informado dos sujeitos ou seus responsáveis legais.

3.2 Características da população

Foram estudados os indivíduos com diagnóstico confirmado de gangliosidose GM1, nas formas juvenil ou crônica, que estão em acompanhamento no Ambulatório de Erros Inatos do Hospital das Clínicas da Unicamp, bem como os pais desses sujeitos. Pacientes com a forma infantil da doença foram avaliados, porém devido as características clínicas levando ao óbito precoce não foi possível a inclusão desses pacientes nessa casuística. Foram incluídos 10 casos de nove famílias, sendo cinco do sexo masculino e cinco do sexo feminino (incluindo um casal de irmãos), além dos pais, totalizando 28 indivíduos. Todas as famílias eram procedentes da região de Campinas/SP ou do sul do estado de Minas Gerais. Em nenhuma das famílias foi descrita consanguinidade parental. Não foi possível detalhar a origem étnica dessas famílias, sendo em sua maioria referidos como “mista”, representada por ibéricos, italianos, alemães, holandeses, franceses, afro-brasileiros e indígenas.

3.2.1 Critérios de inclusão

Para a inclusão nesse projeto de pesquisa foi necessário o diagnóstico confirmado de gangliosidose GM1, forma juvenil ou crônica, baseado na apresentação clínica e na dosagem da atividade reduzida da β -galactosidase, com

neuraminidase normal. Além disso, os pacientes e seus pais assinaram o consentimento livre e esclarecido para a participação na pesquisa. No caso de menores de idade, o consentimento foi fornecido pelos pais ou responsáveis legais.

Os exames bioquímicos foram realizados regularmente em parceria com o laboratório de Referência de Erros Inatos do Metabolismo do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, sendo que a investigação bioquímica foi previamente realizada como parte da rotina de atendimento ambulatorial.

3.2.2 Critérios de exclusão

Não foram chamados para participar da pesquisa pacientes com diagnóstico da forma infantil de gangliosidose GM1, baseado na apresentação clínica, atividade normal da beta-galactosidase em ensaio enzimático específico e(ou) atividade reduzida da neuraminidase em ensaio enzimático específico.

3.3 Estratégia de estudo

Após a coleta de sangue periférico em tubo vacutainer com anticoagulante EDTA, o DNA genômico foi extraído e os 16 exons do gene *GLB1* foram amplificados por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) utilizando os *primers*, listados na tabela 2. Posteriormente as amostras foram submetidas a sequenciamento dos fragmentos amplificados pelos mesmos *primers* já utilizados na PCR para término da triagem de mutações. Em casos de inserção ou suspeita de mosaïcismo foi utilizado o método de clonagem para confirmação dos resultados.

3.4 Procedimentos

As amostras de sangue para obtenção de DNA foram coletadas a partir de punção de veia periférica, por profissional habilitado (médico, enfermeira ou biomédico).

3.4.1 Extração de DNA

O DNA genômico das amostras coletadas foi obtido pela técnica do fenol-clorofórmio (35). A extração de DNA consistiu inicialmente da obtenção de 10 a 15 mL de sangue venoso colhido de cada indivíduo recrutado para o estudo. As amostras foram centrifugadas a 1080 G por 10 minutos e a parte intermediária, onde se localizavam os leucócitos foi transferida para um tubo de fundo cônico de polipropileno. Em seguida foram adicionadas as soluções de RSB (*Reaction Stop Buffer*, contendo 0,1 M de Tris pH 7,0; 0,1 M de KCl; 0,1 M de MgCl₂) até completar o volume de 11 mL no tubo e 60 µL de Nonidet®. Esta solução foi homogeneizada por 10 minutos em agitador e posteriormente centrifugada a 1080 G por 10 minutos e o sobrenadante descartado. Após a adição de 3 mL de solução de SDS para sangue (0,5% de dodecil sulfato de sódio, 1 M de Tris, 1 M de KCl, 1 M de MgCl₂, 0,4 M de NaCl e 20 mM de EDTA) e 10 µL de proteinase K (100 µg/mL) as amostras foram incubadas a 37°C por 24 horas. Após essa etapa foram adicionados 3 mL de fenol, as amostras foram homogeneizadas por 10 minutos em agitador, centrifugadas a 1080 G por mais 10 minutos e a parte orgânica da solução foi descartada. Esse processo foi repetido com 1,5 mL de fenol e 1,5 mL de solução de álcool isoamílico e clorofórmio (1:24), seguida por

mais uma repetição desse processo com 3 mL de solução de álcool isoamílico e clorofórmio (1:24). A precipitação do DNA genômico foi feita com 6 mL de etanol absoluto e o DNA extraído foi armazenado em tubo cônico de polipropileno de 1,5 mL com 200 µL de água para injeção.

3.4.2 Desenho de *primers*

Para a amplificação por reação em cadeia da polimerase e sequenciamento dos éxons do gene *GLB1*, foram desenhados oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) que flanqueiam essas regiões. Esses *primers* foram desenhados com o auxílio do programa *Gene Runner*®, respeitando as seguintes determinações: tamanho entre 18 e 25 nucleotídeos; ausência de complementaridade entre os *primers*; porcentagem semelhante do conteúdo de G e C dos dois *primers*; temperaturas de anelamento parecidas; tamanho do fragmento a ser amplificado até 700 pares de bases.

Foram utilizados, no total, 15 pares de *primers*. As sequências nucleotídicas dos *primers* e temperatura de anelamento (T_a) estão apresentadas na tabela 2.

Tabela 2. Primers utilizados nas reações de PCR e sequenciamento

Éxon	<i>Primer sense</i>	<i>Primer antisense</i>	Ta
1	GCCGTGGGTCCTTAGTCAAG	CTCGTCTCAACACCTCGTTAC	52,8°C
2	TGCTACTCTCAAAGGATCG	ATAGCCACCCTGAGAAATAC	57,9°C
3	TCTTTCTTCTTGACTCTGCC	GCTTTAATTCCCTTTGCC	56,7°C
4	ACCCTTCACGGAACAGAC	TCAGCCTCCCAAAGTGTC	56,7°C
5	CACATTCAAAGCCATCCTG	TAATGTAGATGGATGGGAAC	52,8°C
6	AAAGCTTGCATTAGGGTG	CACTTATAACAACAGCTGC	59,9°C
7	TTAACTTCTTGTCATTTCCACG	TTCTCTCTTAACAGCTGCAAAC	59,9°C
8/9	ACACCTGTCATAGATGGG	CTCCTCAAATTAATCAACAG	59,9°C
10	AGAACTTGTCCCAGAGCTG	CAAGATCAGCCCACCACAG	58,8°C
11	ATGTTTCTGAAGGTTTACC	TCTCACTCCCATCTCTCAC	58,8°C
12	GGGTGCAGTGTGTGAATG	AGAATGGGCACTGCAAGG	54,1°C
13	AATGAATGGCAATAGTGATG	GTTAACAAGTGCAGGCTG	51,7°C
14	CTCCTTGCTGACCTTCTTAC	GAGATTACAGGTGTGAGCC	58,8°C
15	TGCAGAGACATGTGAAGC	CACGATATCTCACTAACAGC	58,8°C
16	CTTCCTCAGGGCTTTCGGTG	GTGGCATGACAGGGAGGATC	64,9°C

3.4.3 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Os fragmentos de DNA genômico foram amplificados por reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando os *primers* descritos na tabela 2. Cada reação com volume final de 12 microlitros, contendo 10,42 mM de Tris-HCl (pH 8,8), 52,1 mM de KCl, 0,083% de NONIDET®, 2,60 mM de MgCl₂, 0,083 mM de cada dNTP, 7 pmoles de cada primer, 0,5 u de *Taq* DNA polimerase e 50 ng/μL de DNA.

Em seguida as amostras foram submetidas a uma desnaturação inicial a 94°C por 5 min, seguidas por 40 ciclos de 30 segundos de desnaturação a 94°C, 30 segundos em temperatura de anelamento (Ta) e 45 segundos de extensão a 72°C. Depois do último ciclo as amostras passaram por uma extensão final de 10 min a 72°C (Figura 5). As reações de PCR foram realizadas em termociclador Eppendorf®.

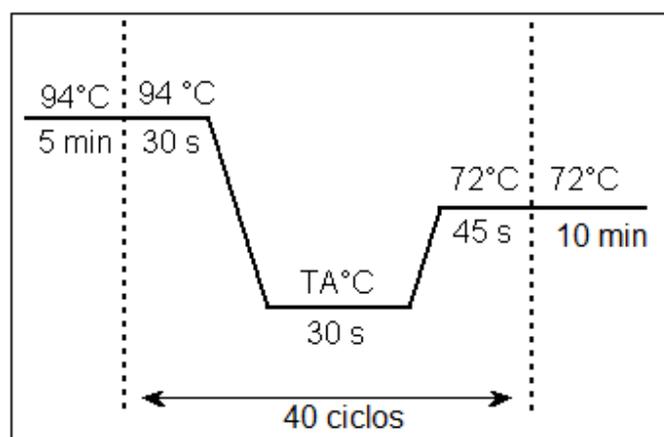


Figura 5. Condições utilizadas na PCR.

Para determinar a temperatura de anelamento ideal dos pares de *primers*, foram realizados PCRs com gradientes de temperatura. Para os éxons 3, 6, 10, 11

e 12 foi necessário minimizar a amplificação inespecífica utilizando a técnica de *Touchdown PCR* (36), em que a temperatura de anelamento no primeiro ciclo é programada para 10°C acima da temperatura de anelamento específica dos primers, em cada ciclo a temperatura diminui 0,5°C, a partir do 20º ciclo segue-se a temperatura de anelamento ideal de cada *primer* descrita na tabela 2 (figura 6).

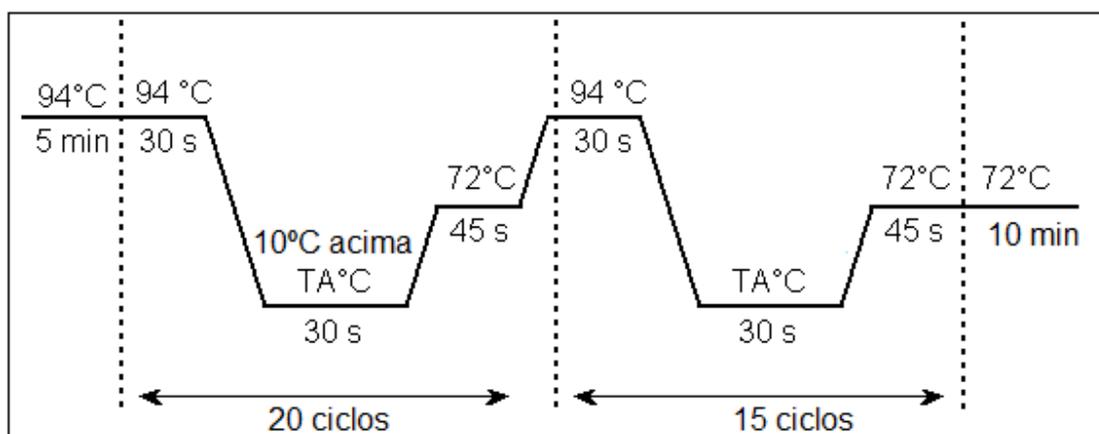


Figura 6. Condições utilizadas na PCR *touchdown*

Os produtos de amplificação (*amplicons*) foram visualizados em gel de agarose 1% corado com *SYBR® Safe DNA stain*.

3.4.4 Reação com Exo-sap

Para preparação das amostras para o sequenciamento utilizou-se a purificação com Exo-sap (exonuclease I e fosfatase alcalina de camarão) para remover o excesso de *primers* e de nucleotídeos. Adicionou-se 0,7 µL de Exo-sap a 1,5 µL de PCR. As amostras foram incubadas a 37°C por 15 minutos e depois aquecidas a 80°C por mais 15 minutos.

3.4.5 Sequenciamento por eletroforese capilar

Os *amplicons* foram submetidos a sequenciamento no equipamento ABI 3500xL (*Life Technologies*®) por eletroforese capilar utilizando o método de Sanger com o *Kit BigDye® Terminator Cycle Sequencing Standart Version 3.1*, a reação de sequenciamento foi realizada com volume final de 10 µL contendo 4,5 µL de água destilada, 1 µL de *BigDye*®, 2 µL de solução tampão (fornecido pelo fabricante), 0,5 µL de *primer* (10pmol/µL) e 2 µL do produto tratado com Exo-sap.

As reações foram realizadas em termociclador Eppendorf® nas seguintes condições: 35 ciclos de 10 segundos a 96°C, cinco segundos a temperatura de anelamento de cada *primer* descrito na tabela 2 e quatro minutos a 60°C (figura 7). Para o éxon 16 a temperatura utilizada na reação de sequenciamento foi de 59°C.

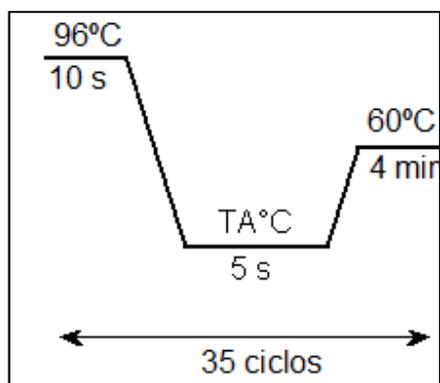


Figura 7. Condições utilizadas na reação de sequenciamento

A purificação das amostras para sequenciamento foi realizada com EDTA (125 mM) e etanol de acordo com as instruções do fabricante. Após a finalização do processo de purificação as amostras foram ressuspensas em 10 µL de formamida *Hi-Di*®.

Todas as alterações encontradas foram testadas em duplicata.

Todas as alterações inéditas identificadas por meio da técnica de sequenciamento foram estudadas em um grupo controle de 50 indivíduos (100 alelos) normais, provenientes do banco de armazenamento de DNA do Laboratório de Genética Molecular da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, para certificar de que não se tratavam de variantes polimórficas normais da população.

Os resultados obtidos através do sequenciamento foram salvos em eletroferogramas e analisados com o programa *Chromas*. As sequências foram comparadas com as sequências normais dos genes *GLB1* (número ENST00000307363) disponibilizado no banco de dados *Ensembl Genome Browser* (37).

As trocas de bases encontradas nos genes foram pesquisadas em banco de dados especializados para verificar se a alteração já era descrita. O primeiro pesquisado foi o *Ensembl Genome Browser*, para verificar se tratava-se de uma alteração descrita e qual sua frequência na população. O outro banco de dados utilizado foi o *Humam Gene Mutation Database* (HGMD) (38).

3.4.6 Análise *in silico* das alterações inéditas

A análise do resultado da triagem de mutações nos pacientes permitiu a identificação de duas alterações inéditas, as quais tiveram seu impacto sobre a formação da proteína avaliado por programas de predição.

As alterações inéditas encontradas foram avaliadas *in silico* nos programas *MutPred*, *PolyPhen 2*, *Snps&GO*, *SIFT*, *SNAP* e *Phd-SNP* (39, 40, 41, 42, 43, 44), listados na tabela 3.

Tabela 3. Lista de algoritmos e endereço eletrônico.

Algoritmo	Endereço eletrônico
<i>MutPred</i>	http://mutpred.mutdb.org
<i>Polyphen 2</i>	http://genetics.bwh.harvard.edu
<i>Snps&GO</i>	http://snps-and-go.biocomp.unibo.it/snps-and-go/
<i>SIFT</i>	http://sift.jcvi.org/
<i>SNAP</i>	http://www.rostlab.org/services/snap/
<i>Phd-SNP</i>	http://snps.biofold.org/phd-snp/phd-snp.html

Os softwares *MutPred*, *Polyphen 2* e *Snps&GO* avaliaram a substituição da base nitrogenada fundamentando-se na combinação de parâmetros funcionais e estruturais das proteínas. Os programas *SIFT*, *SNAP* e *Phd-SNP* consideram as informações evolutivas (45).

3.4.7 Análise com enzima de restrição

Uma alteração descrita na literatura especializada foi encontrada em 40% dos alelos mutados da casuística. Para confirmar os resultados encontrados, descartando a possibilidade de a alteração ser um artefato de técnica, a mutação foi investigada com a enzima de restrição *Hinf I* (figura 8) em todos os pacientes.

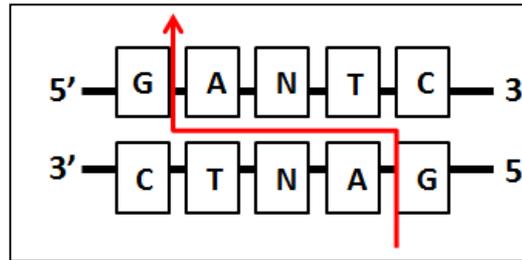


Figura 8. Sítio de restrição para a enzima *Hinf I*

A reação enzimática foi feita para um volume final de 16 μL , contendo 5 μL de PCR, 0,625 mM de Tris-HCl, 0,625 mM de MgCl_2 , 6,25 mM de KCl, 0,0001 mg de BSA, 10 u de enzima. As reações foram incubadas a 37°C por 16 horas. Os produtos da digestão foram visualizados em gel de agarose 1,5% corado com *SYBR® Safe DNA stain*.

A alteração abole um dos dois sítios de restrição para a enzima *Hinf I* (G'ANTC) nos 418 pares de base do éxon 15, clivando o alelo mutante em fragmentos de 387 e 31 pares de base, enquanto o alelo normal é clivado em 303, 84 e 31 pares de base (figura 9).

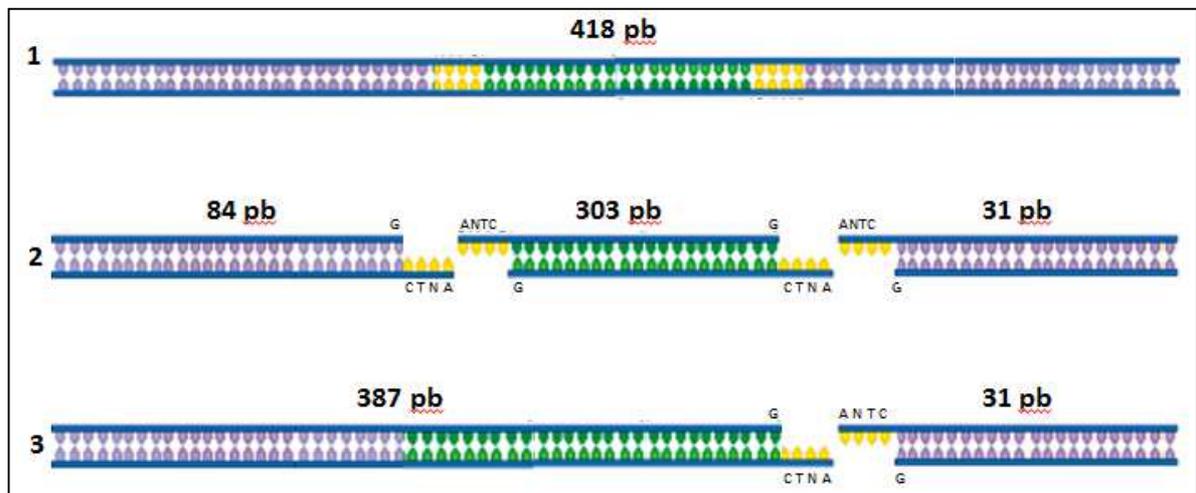


Figura 9. Fragmentos formados pela digestão com a enzima de restrição *Hinf I* no éxon 15. 1 Fragmento inteiro, 2 Alelo normal e 3 Alelo mutante sem um dos sítios de restrição para a enzima.

3.4.8 Clonagem gênica

A triagem de mutações através da técnica de sequenciamento permitiu a identificação de uma inserção previamente descrita na literatura especializada, para confirmação da mesma foi realizado o experimento de clonagem gênica, que consistiu em inserir o éxon de interesse, com a inserção, em células bacterianas e isolá-las em colônias. O experimento consistiu em três etapas: ligação, transformação e extração.

3.4.8.1 Ligação

Primeira etapa que consistiu na ligação entre o fragmento de DNA a ser clonado, obtido pela técnica de PCR descrita previamente e chamado inserto, com o plasmídeo (moléculas de DNA fita dupla extracromossomal encontrados em todas as espécies de bactérias) para formar uma molécula de DNA recombinante

utilizando o kit *pGEM®-T Vector System I* seguindo as recomendações do fabricante (Promega).

3.4.8.2 Transformação

A etapa de transformação consistiu na introdução de um DNA exógeno em células bacterianas hospedeiras (*Escherichia coli*) por choque térmico na temperatura de 42°C, criaram-se poros na membrana e o DNA foi incorporado à célula bacteriana. O protocolo utilizado foi fornecido pelo fabricante (Promega). Foi adicionado à célula competente 10 µL da reação de ligação. Essa mistura ficou no gelo por 30 minutos e em seguida foi incubada 42°C por um minuto e 30 segundos e novamente foi colocada no gelo por mais um minuto. Após essa etapa foram adicionados de 400 a 800µL de meio SOC sendo a cultura levada a agitação vigorosa a 37°C por uma hora.

Cerca de 200µL foram plaqueados em placas LB-ágar mais o antibiótico apropriado. As placas foram deixadas em incubadora a 37 °C por 12-18 horas.

3.4.8.3 Extração de DNA plasmidial (mini-prep)

Para esta etapa foi utilizada a mini-preparação caseira, que consiste de ressuspensão com 300µl da solução 1 (Tris-HCl 50mM, pH 8.0, EDTA 10mM, pH 8,0 e 6µl de RNase 1mg/mL), seguido da adição de 300µl de solução 2 (NaOH 200mM, SDS 1%), agitação por inversão suave do tubo cinco vezes, incubação a temperatura ambiente por 5 minutos, 300µl de solução 3 (acetato de potássio 3M, pH 5.5), agitação por inversão, centrifugação a temperatura a 14°C (1000g) durante 10 minutos, transferência de 700-800µl do sobrenadante para um novo

tubo, precipitação primeiro com 400µl de isopropanol seguida de inversão e centrifugação a 1000g por 10 minutos a 4°C, descarte do sobrenadante, nova precipitação com 500µl de álcool etílico 70%, inversão do tubo e centrifugação durante 5 minutos a 1000g, descarte do sobrenadante e eluição em 30µl de água deionizada.



4. Resultados

Para os 10 indivíduos com diagnóstico confirmado de gangliosidose GM1, nas formas juvenil ou crônica foi realizada a dosagem da atividade da enzima lisossômica β -gal (tabela 4) em parceria com o laboratório de Referência de Erros Inatos do Metabolismo do Hospital de Clínicas de Porto Alegre como parte da rotina de atendimento ambulatorial.

Os 16 éxons do gene *GLB1* foram amplificados por PCR (figura 10) utilizando os *primers*, descritos na tabela 2, que flanqueiam essas regiões e as respectivas junções íntron-éxon.

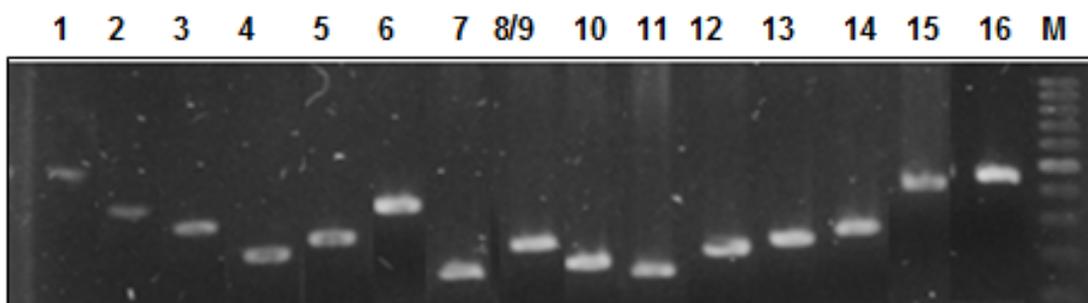


Figura 10. Amplificação dos 16 éxons do gene *GLB1* por PCR. **1** éxon 1 (441pb), **2** éxon 2 (329 pb), **3** éxon 3 (284 pb), **4** éxon 4 (201 pb), **5** éxon 5 (235 pb), **6** éxon 6 (331 pb), **7** éxon 7 (160 pb), **8** éxon 8/9 (401 pb), **9** éxon 10 (209 pb), **10** éxon 11 (185 pb), **11** éxon 12 (208 pb), **12** éxon 13 (232 pb), **13** éxon 14 (278 pb), **14** éxon 15 (418 pb), **15** éxon 16 (427 pb).

Em seguida foi realizado o sequenciamento, em que foram encontradas seis mutações *missense* descritas e uma inédita, uma alteração neutra inédita, um polimorfismo em sítio de *splicing* descrito e uma inserção descrita. Todas as alterações foram encontradas em heterozigose. A tabela 4 mostra a distribuição das mutações nas famílias, a dosagem enzimática e os principais aspectos clínicos dos pacientes.

Tabela 4. Dosagem enzimática, aspectos clínicos e mutações encontradas.

Paciente	β -galactosidase tecido	Enzima de controle simultânea tecido	Neuraminidase tecido	Clínica idade de início	Mutação 1 Origem	Mutação 2 Origem	Mutação 3 Origem	Polimorfismo Origem
1	15 (VR: 394 – 1440) 3,8% Fibroblastos	α -iduronidase 77 (VR: 74 – 148) Fibroblastos	17 (VR: 30 – 38) Fibroblastos	“Morquio B” 3 anos	* p.T384S NA	p.T500A Materna	-	-
2	6 (VR: 78 – 280) 7,7% Leucócitos	beta-glucosidase 12.2 (VR: 10 – 45) Leucócitos	NR	Displasia espôndilo epifisária tarda 2 ½ anos	p.R59H Materna	p.T500A NA	-	IVS12+8T>C Materna
3a	3.3 (VR: 78 – 280) 4,2% Leucócitos	α -iduronidase 204 (VR: 74 – 148) Leucócitos	4.9 (VR: 1,02 – 5,9) Fibroblastos	Neuroinvolução + displasia óssea 7 anos	p.R59H Materna	p.R201H Paterna	-	IVS12+8T>C Materna
3b	4 (VR: 78 – 280) 5,1% Leucócitos	beta-glucosidase 9,8 (VR: 10 – 45) Leucócitos	NR	Neuroinvolução + “Morquio B” 8 anos	p.R59H Materna	p.R201H Paterna	-	IVS12+8T>C Materna
4	7.8 (VR: 78 – 280) 10% Leucócitos	beta-glucosidase 8.6 (RV: 10 – 45) Leucócitos	NR	“Morquio B” 14 meses	p.T500A Materna	c.1717-1722insG NA	-	-
5	21 (VR: 394 – 1440) 5,3% Fibroblastos	α -iduronidase 48 (VR: 32 – 52) Leucócitos	43 (VR: 30 – 38) Fibroblastos	“Morquio B” 6 anos	p.T500A Materna	-	-	-
6	9 (VR: 78 – 280) 11,5% Leucócitos	α -iduronidase 130 (VR: 74 – 148) Fibroblastos	54 (VR: 30 – 38) Fibroblastos	“Morquio B” + atraso de fala 3 ½ anos	p.G311R Materna	p.T500A Paterna	-	-
7	11.7 (VR: 394 - 1440) 2,9% Fibroblasts	Arilsulfatase A 9.1 (VR: 5 – 20) Leucócitos	19 (VR: 30 – 38) Fibroblastos	Neuroinvolução 3 anos	p.F107L Materna	p.L173P -	* p.P152P Paterna	-
8	9.3 (VR: 78 – 280) 11,9% Leucócitos	Galactose 6-sulfate sulfatase 0.72 (VR: 0.53 – 1.03) Fibroblastos	NR	“Morquio B” 5 anos	* p.I354S NA	p.T500A Materna	-	-
9	36 (VR: 394 – 1440) 9,1% Fibroblastos	α -iduronidase 114 (VR: 74 – 148) Fibroblastos	33 (RV: 30 – 38) Fibroblastos	Dificuldade escolar + alteração marcha 12 anos	p.T500A Materna	c.1717-1722insG Paterna	-	-

Legenda: valores em nmol/h/mg proteína; NR = não realizado; VR = valor de referência; NA = não foi possível avaliar; (*) mutações inéditas.

4.1 Mutação p.R59H

Esta mutação, encontrada nas famílias 2 e 3, nos pacientes 2, 3a e 3b e em suas mães, provoca a troca de uma base G (guanina) por uma base A (adenina) no nucleotídeo 321 do gene *GLB1* (c.321G>A), levando à substituição do aminoácido arginina por histidina no códon 59 (figura 11).

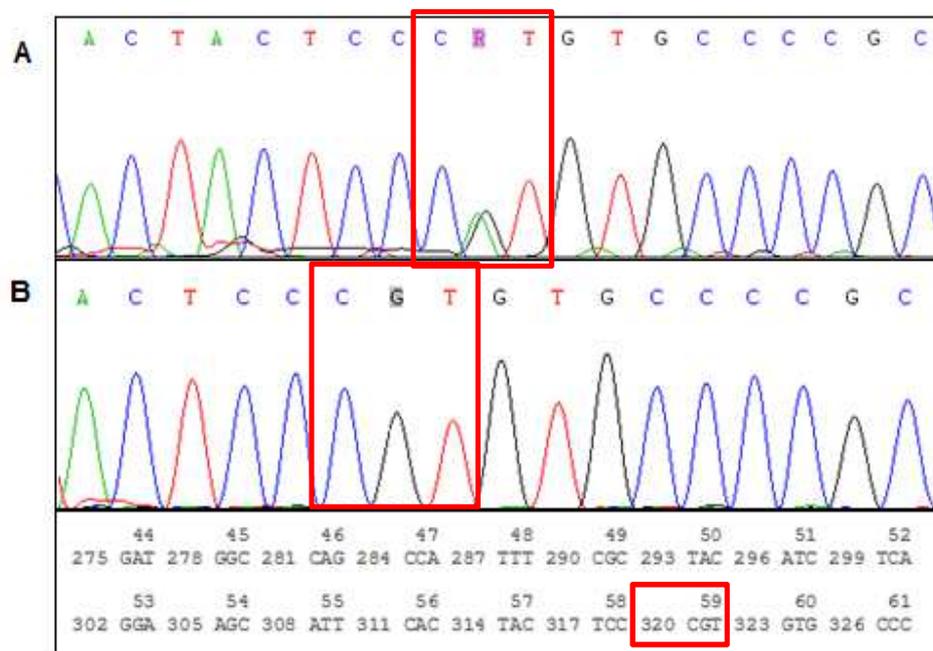


Figura 11. Eletroferograma do fragmento que contém o éxon 2. **A:** alteração em heterozigose evidenciada por dois picos (A e G) no mesmo lugar. **B:** sequência do gene *GLB1* de referência da mesma região.

4.2 Mutação p.F107L

A mutação p.F107L foi encontrada no paciente da família 7 e em sua mãe. Essa mutação consiste na troca de uma base T (timina) por uma base C (citosina) na posição 464 (c.464T>C) do éxon 3 do gene *GLB1*, levando a troca do aminoácido fenilalanina por leucina no códon 107 (figura 12).

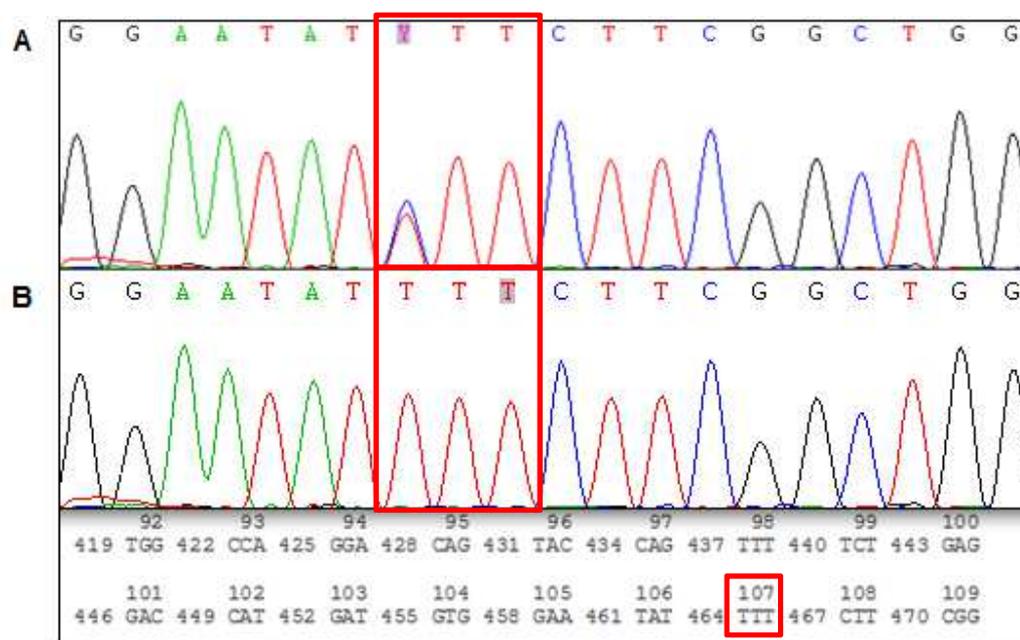


Figura 12. Eletroferograma do fragmento que contém o éxon 3. **A:** alteração em heterozigose evidenciada por dois picos (T e C) no mesmo lugar. **B:** sequência do gene *GLB1* de referência da mesma região.

4.3 Alteração neutra p.P152P

A alteração neutra p.P152P foi encontrada no paciente da família 7 e em seu pai. Trata-se de uma alteração neutra não descrita em que ocorre a troca de uma base A por uma base G na posição 601 (c.601A>G) do éxon 4 do gene *GLB1* (figura 13).

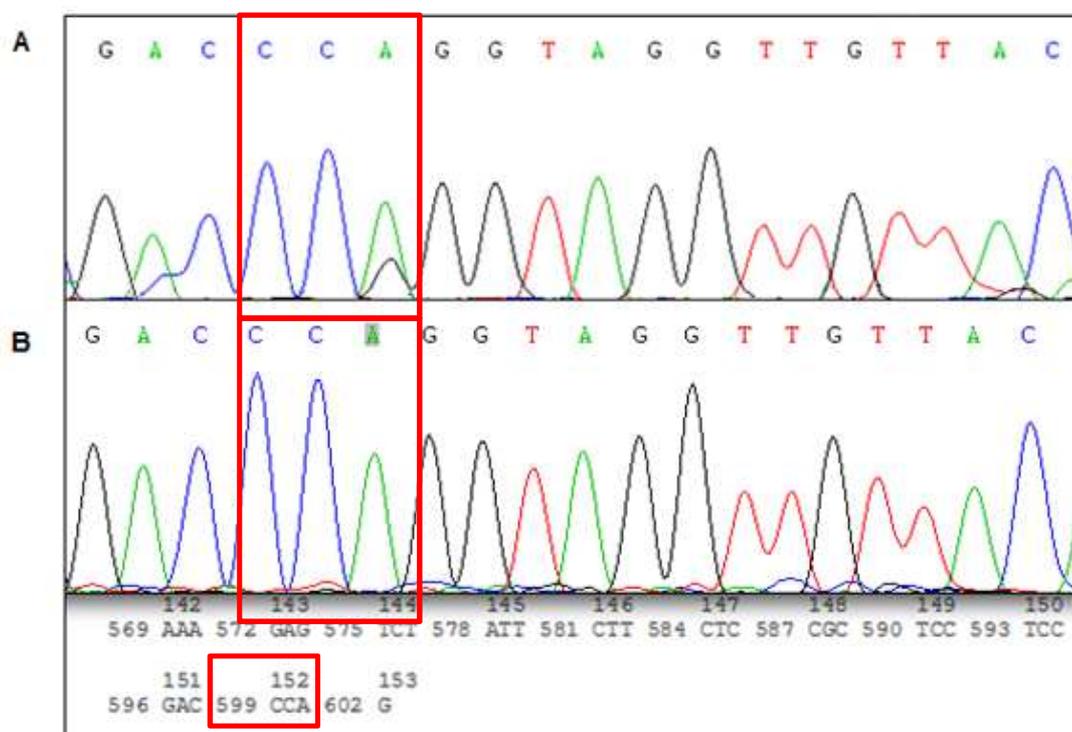


Figura 13. Eletroferograma do fragmento que contém o éxon 4. **A:** alteração em heterozigose evidenciada por dois picos (A e G) no mesmo lugar. **B:** sequência do gene *GLB1* de referência da mesma região.

4.4 Mutação p.L173P

A mutação p.L173P foi encontrada apenas no paciente da família 7. Nesse caso ocorre uma troca de uma base nitrogenada C por uma T na posição 663 do éxon 5 (c.663C>T) (figura 10), levando a troca do aminoácido leucina por prolina (figura 14).

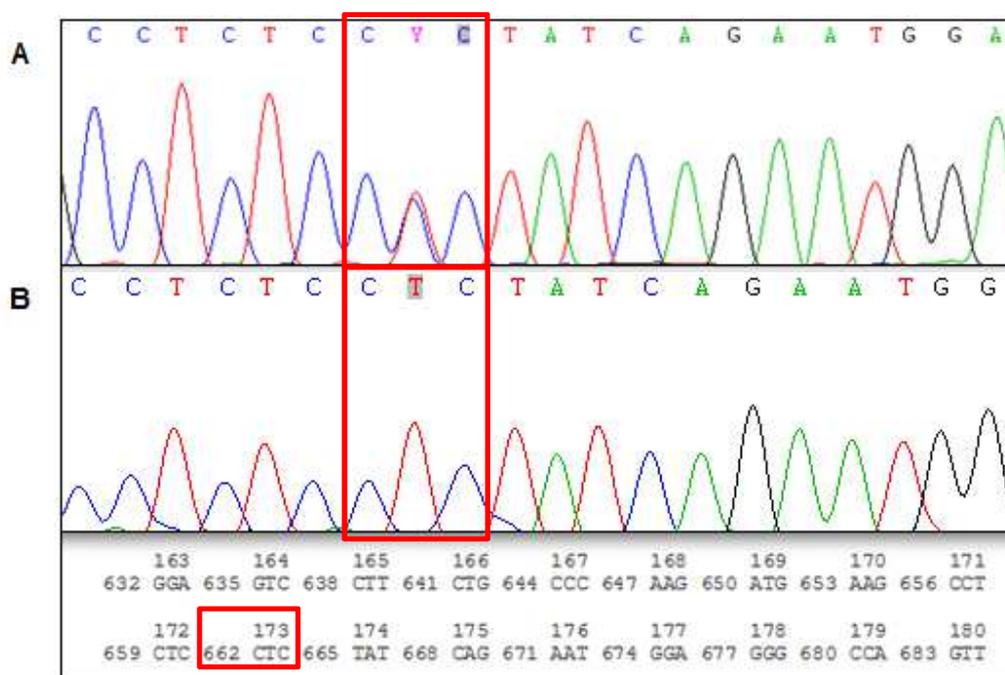


Figura 14. Eletroferograma do fragmento que contém o éxon 5. **A:** alteração em heterozigose evidenciada por dois picos (T e G) no mesmo lugar. **B:** sequência do gene *GLB1* de referência da mesma região.

4.5 Mutação p.R201H

A mutação p.R201H foi encontrada na família 3 (pacientes e pai) e representa a troca de uma base G por uma base A no nucleotídeo 747 do éxon 6 do gene *GLB1* (C.747G>A) (figura 15), que determina a formação de um aminoácido histidina no lugar de arginina, no códon 201.

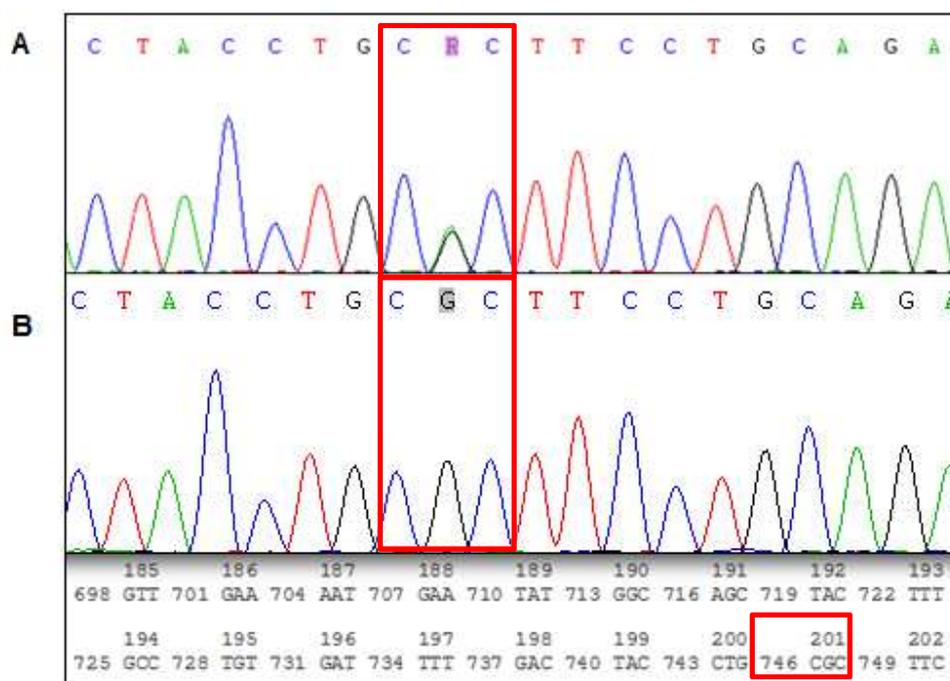


Figura 15. Eletroferograma do fragmento que contém o éxon 6. **A:** alteração em heterozigose evidenciada por dois picos (A e G) no mesmo lugar. **B:** sequência do gene *GLB1* de referência da mesma região.

4.6 Mutação p.G311R

A mutação p.G311R foi encontrada no paciente da família 6 e em sua mãe, sendo que nesse caso ocorreu a troca de uma base G por uma base A no nucleotídeo 1076 do éxon 9 do gene *GLB1* (c.1076G>A), levando à troca de um aminoácido glicina por arginina no códon 311, como demonstrado na figura 16.

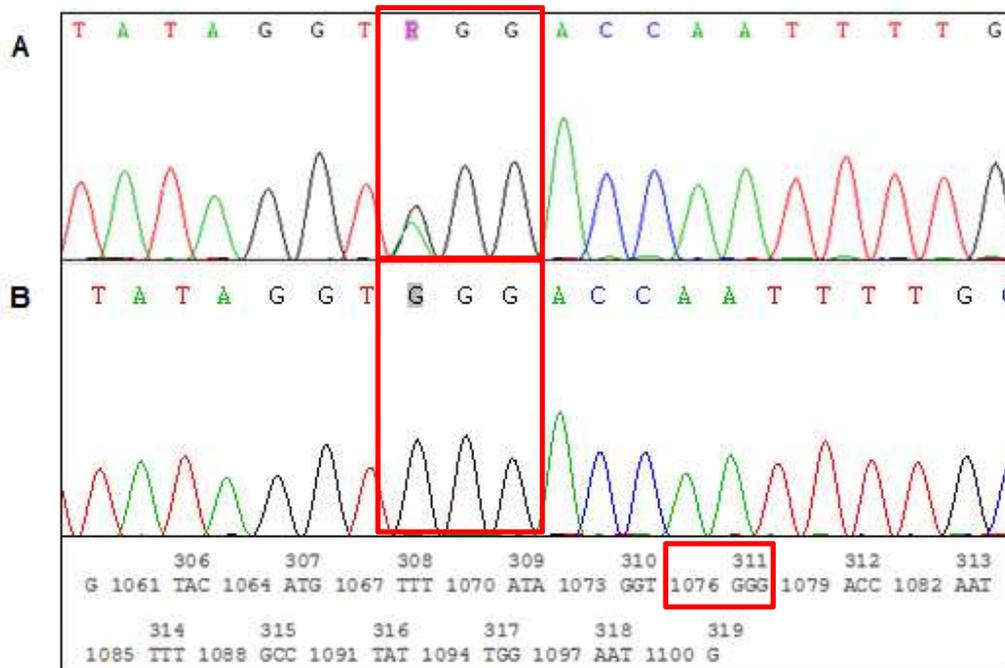


Figura 16. Eletroferograma do fragmento que contém o éxon 9. **A:** alteração em heterozigose evidenciada por dois picos (A e G) no mesmo lugar. **B:** sequência do gene *GLB1* de referência da mesma região.

4.7 Alteração inédita p.I354S

A alteração inédita p.I354S foi encontrada no paciente da família 8, não foi possível avaliar se a variação é de origem paterna. Essa alteração consiste na troca de um T por um G no nucleotídeo 1206 no éxon 10 do gene *GLB1* (C.1206T>G) (figura 17), levando à troca do aminoácido isoleucina por serina no códon 354.

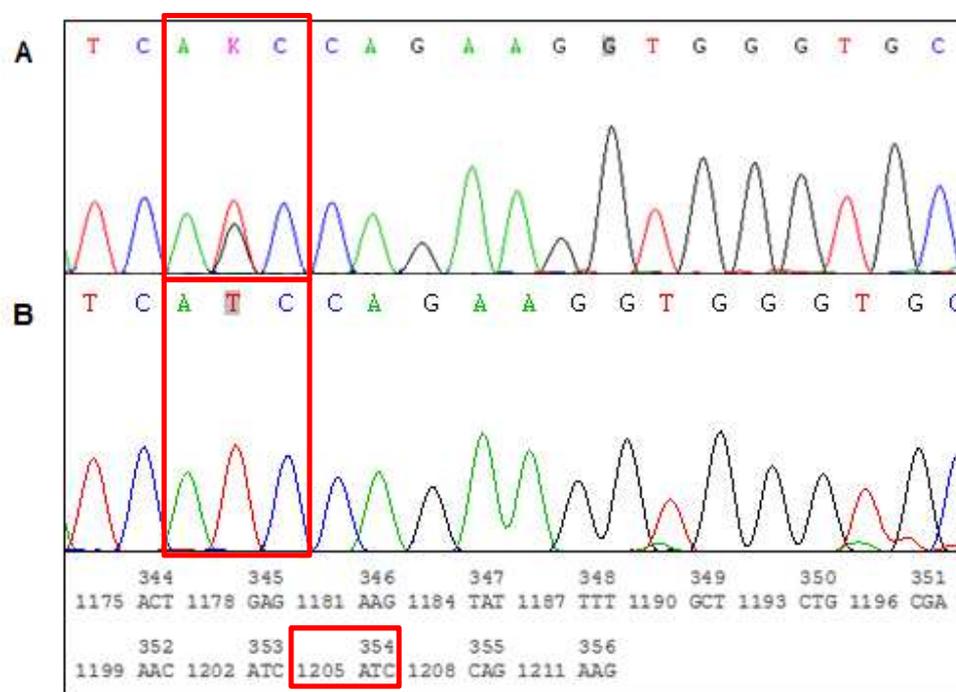


Figura 17. Eletroferograma do fragmento que contém o éxon 10. **A:** alteração em heterozigose evidenciada por dois picos (T e C) no mesmo lugar. **B:** sequência do gene *GLB1* de referência da mesma região.

4.8 Alteração inédita p.T384S

A variação inédita p.T384S foi encontrada na paciente da família 1, não sendo possível avaliação se a alteração era de origem paterna. Nesse caso ocorre a troca de uma base A por uma base T no nucleotídeo 1295 no éxon 12 do gene *GLB1* (c.1295A>T) (figura 18), levando à formação do aminoácido serina no lugar de treonina, no códon 384.

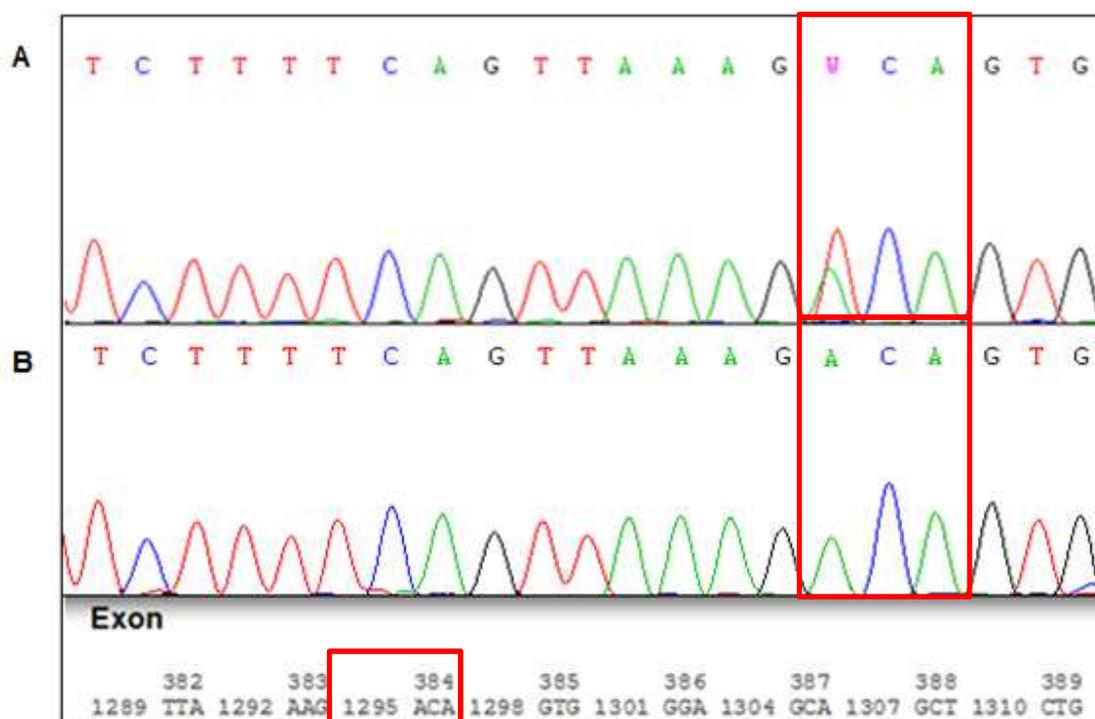


Figura 18. Eletroferograma do fragmento que contém o éxon 12. **A:** alteração em heterozigose evidenciada por dois picos (A e T) no mesmo lugar. **B:** sequência do gene *GLB1* de referência da mesma região.

4.9 Polimorfismo IVS12+8T>C

O polimorfismo IVS12+8T>C foi encontrado em heterozigose nas famílias 2 e 3 nos pacientes 2, 3a , 3b e nas mães. Nesse caso ocorre a troca de uma base T por uma base C no oitavo nucleotídeo após o término do exon 12 (figura 19).

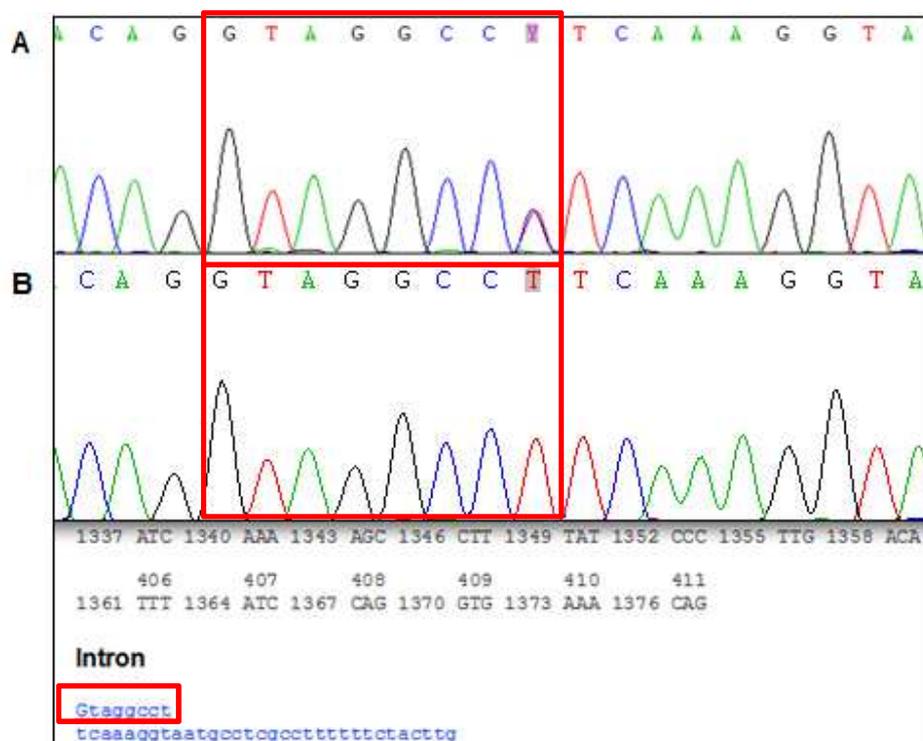


Figura 19. Eletroferograma do fragmento que contém o éxon 12. **A:** alteração em heterozigose evidenciada por dois picos (T e C) no mesmo lugar. **B:** sequência do gene *GLB1* de referência da mesma região.

4.10 Mutação p.T500A

Esta alteração foi encontrada nas famílias 1, 2, 4, 5, 6, 8 e 9. Nas famílias 1, 5, 8 e 9 a mutação é de origem materna, na família 6 a variação é de origem paterna e nas famílias 2 e 4 é provável que a origem seja paterna, mas não foi possível realizar essa avaliação. Nesse caso ocorre a troca de uma base A por uma base G no nucleotídeo 1643 no éxon 15 do gene *GLB1* (c.1643A>G) (figura 20), levando à formação do aminoácido alanina no lugar de treonina, no códon 500.

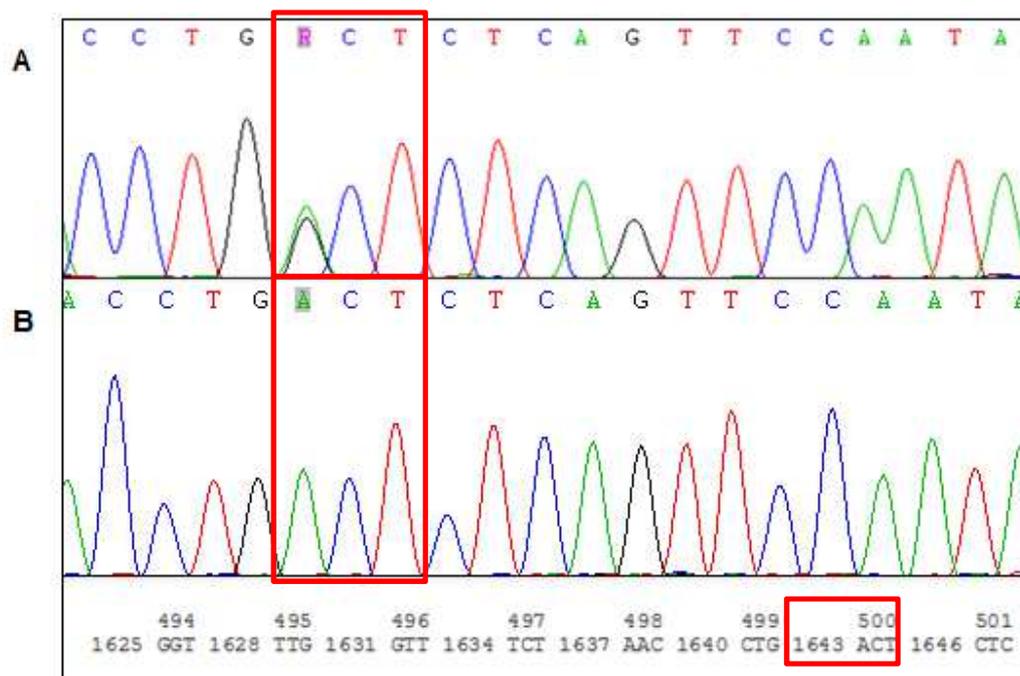


Figura 20. Eletroferograma do fragmento que contém o éxon 15. **A:** alteração em heterozigose evidenciada por dois picos (A e G) no mesmo lugar. **B:** sequência do gene *GLB1* de referência da mesma região.

4.11 Inserção c.1717-1722insG

A inserção de um G em um *cluster* de seis guaninas, entre os nucleotídeo 1717 e 1722, no éxon 15 (figura 21) provoca a formação de um *stop* códon após a codificação de quatro códons diferentes.

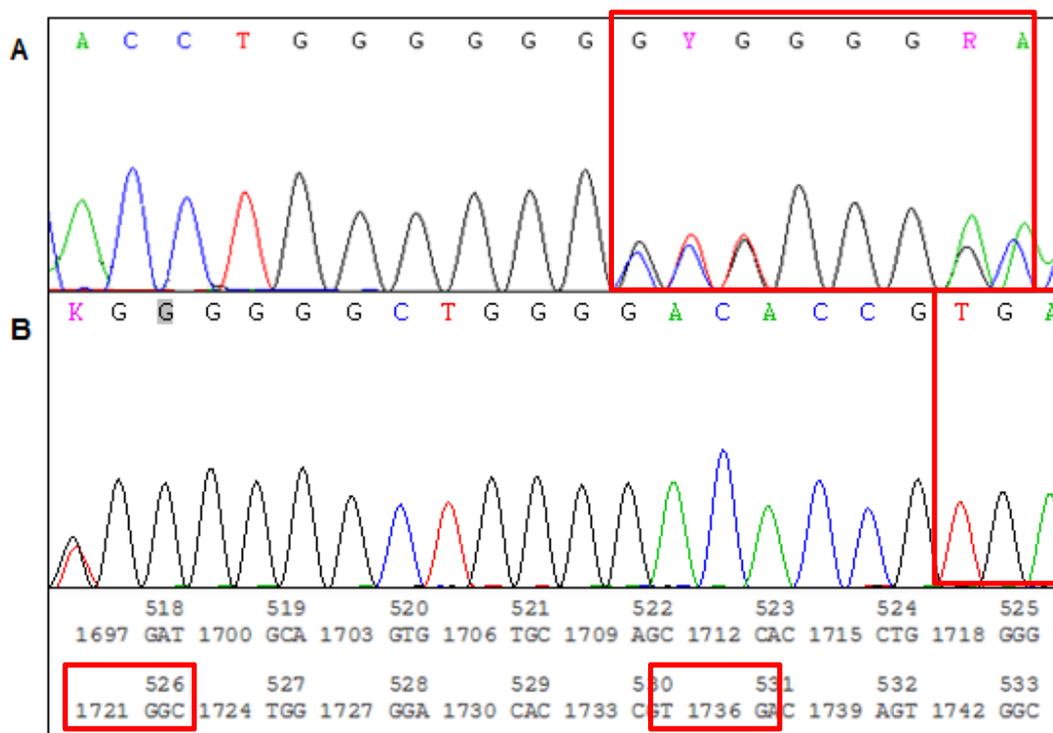


Figura 21. Eletroferograma do fragmento que contém o éxon 15. **A:** alteração em heterozigose evidenciada por dois picos no mesmo lugar até o final da sequência do fragmento iniciado a partir do *primer forward*. **B:** formação do *stop* códon evidenciado no fragmento do éxon 15 iniciado a partir do *primer reverse* e sequência do gene *GLB1* de referência da mesma região.

4.12 Análise *in silico*

Para as duas alterações inéditas encontradas foi realizada a análise de predição utilizando os algoritmos *MutPred*, *Polyphen 2*, *Snps&GO*, *SIFT*, *SNAP* e *Phd-SNP*, os resultados encontrados estão listados na tabela 5.

Tabela 5. Resultados análise *in silico* das novas alterações encontradas.

Alteração nova	<i>MutPred</i>	<i>Polyphen 2</i>	<i>Snps&GO</i>	<i>SIFT</i>	<i>SNAP</i>	<i>Phd-SNP</i>
p.I354S	78,8% (patogênica)	1 (deletéria)	Relacionada à doença	Deletéria	Neutra	Relacionada à doença
p.T384S	40% (patogênica)	0.02 (Neutra)	Neutra	Neutra	Neutra	Neutra

Por ter ocorrido diferenças nos resultados das alterações testadas foi realizada uma comparação entre os algoritmos com a finalidade de avaliar qual apresentava resultado mais confiável. Para isso todas as mutações previamente descritas e comprovadamente patogênicas, através de análise funcional, encontradas nos pacientes dessa casuística foram testadas nos algoritmos citados.

Como é possível observar no quadro 1, *Phd-SNP* apresentou melhores resultados na comparação entre as mutações.

Mutação	MutPred	Polyphen 2	Snps&GO	SIFT	SNAP	Phd-SNP
p.R59H	97,4% (patogênica)	1 (deletéria)	Relacionada à doença	Deletéria	Não neutra	Relacionada à doença
p.F107L	74,3% (patogênica)	1 (deletéria)	Relacionada à doença	Deletéria	Não neutra	Relacionada à doença
p.L173P	92,5% (patogênica)	1 (deletéria)	Relacionada à doença	Deletéria	Não neutra	Relacionada à doença
p.R201H	82,9% (patogênica)	1 (deletéria)	Relacionada à doença	Neutra	Neutra	Relacionada à doença
p.T500A	49,5% (possível patogênica)	0,74 (Possível deletéria)	Neutra	Neutra	Não neutra	Relacionada à doença

Quadro 1. Resultados comparação dos algoritmos para análise *in silico*.

4.13 Digestão com enzima *Hinf I*

Devido à alta frequência da mutação p.T500A no grupo de pacientes estudados, a digestão com a enzima *Hinf I* foi utilizada em todos os pacientes e pais em que a mutação foi identificada pelo método de sequenciamento, para confirmação dos resultados encontrados, descartando a hipótese de ser um artefato de técnica.

Como descrito anteriormente, a alteração abole um dos dois sítios de restrição para a enzima *Hinf I* no éxon 15, clivando o alelo mutante em fragmentos de 387 e 31 pares de base, enquanto o alelo normal é clivado em 303, 84 e 31 pares de base. O método permitiu a confirmação de todos os casos como demonstrado na figura 22.

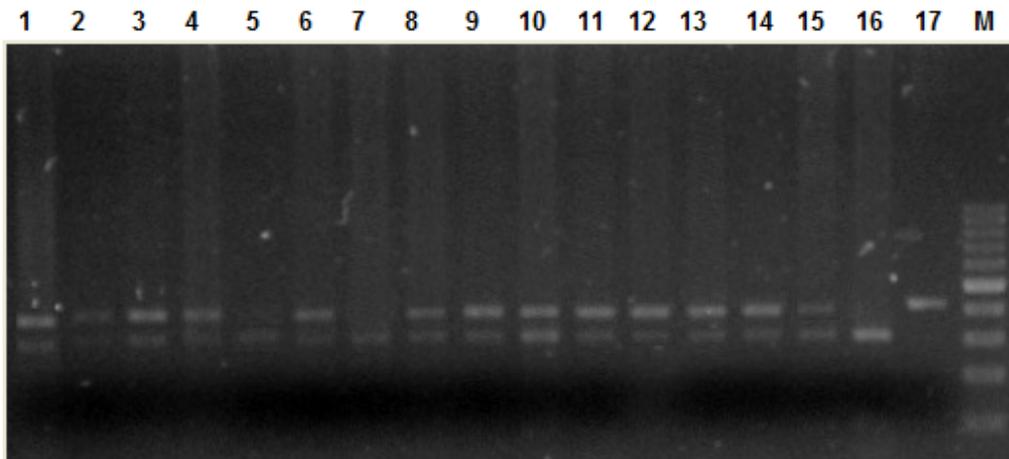


Figura 22. Eletroforese em gel de agarose 2% mostrando a digestão enzimática da mutação p.T500A. **1** paciente família 1, **2** mãe família 1, **3** paciente família 2, **4** mãe família 2, **5** irmão não afetado família 2, **6** paciente família 4, **7** mãe família 4, **8** paciente família 5, **9** mãe família 5, **10** paciente família 6, **11** pai família 6, **12** paciente família 8, **13** mãe família 8, **14** paciente família 9, **15** mãe família 9, **16** controle sem mutação, **17** PCR sem digerir e **18** marcador 100pb.

4.14 Clonagem

A confirmação da inserção c.1717-1722insG foi realizada através do método de clonagem gênica descrito anteriormente. No paciente da família 5 foi possível visualizar tanto o alelo normal quanto o alelo com a inserção (figura 23 e 24), confirmando a alteração em heterozigose.

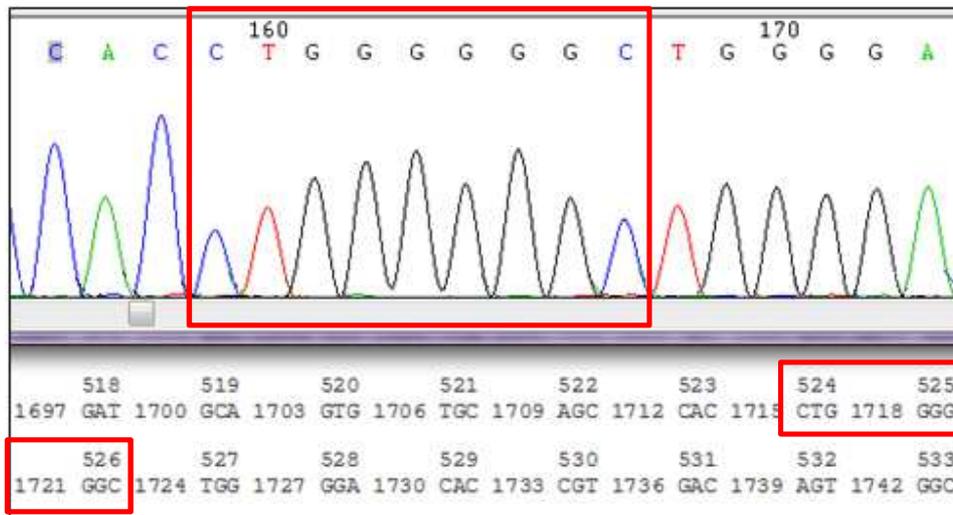


Figura 23. Eletroferograma mostrando o alelo normal do paciente da família 5.

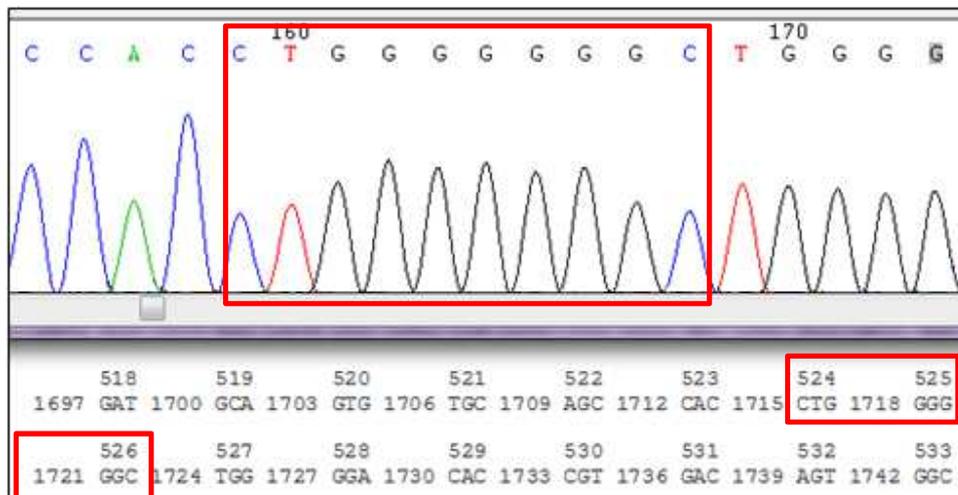


Figura 24. Eletroferograma mostrando o alelo mutante do paciente da família 5.



5. Discussão

5.1 Mutação p.R59H

A mutação p.R59H foi encontrada em duas famílias, não aparentadas, dessa casuística, famílias 2 e 3. Na família 2 foi possível realizar a triagem da mutação apenas na mãe do paciente e observou-se que a alteração é de origem materna. Na família 3 ambos os pais foram avaliados e concluiu-se que a mutação é de origem materna.

Essa mutação foi descrita por Morrone et al. (1997) (46) em um paciente com a forma infantil da gangliosidose GM1 e está associada a pacientes de origem cigana (norte da Índia) que a apresentaram em homozigose. Em 2007, Santamaria et al. descreveram a mutação como mais frequente, presente em 15,8% dos alelos mutantes no grupo de pacientes estudado, todos de origem argentina.

A variação foi encontrada em um grande número de pacientes não relacionados, sugerindo maior susceptibilidade deste códon para alterações (20).

Em 2006, a mutação foi estudada por Sinigerska et al. Nesse estudo a frequência da variação e a história de famílias brasileiras publicadas previamente por Silva et al., bem como de famílias europeias publicadas por Santamaria et al. (2006 e 2007), foram analisadas e concluiu-se que o haplótipo encontrado em ciganos dos Balcãs era idêntico ao dos pacientes brasileiros, o que explicaria um efeito fundador para essa mutação no Rio Grande do Sul (21).

Nos pacientes estudados pelo grupo de pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande Sul essa mutação apresentou uma frequência de 19,2%, sendo considerada a segunda alteração mais frequente na região (14). Além disso, a variação está geralmente associada ao polimorfismo S532G.

Em estudos funcionais prévios, a atividade residual da enzima β -gal foi de 0,9% (17). No caso do paciente da família 2, a atividade enzimática residual foi de 7,7%, tendo sido mensurada apenas em leucócitos. Quanto à família 3, foi de 4,2% em leucócitos e 7,1% em fibroblastos na paciente 3a, e de 5,1% em leucócitos em seu irmão, paciente 3b. A diferença entre a atividade enzimática descrita e a avaliada nos pacientes dessa casuística provavelmente ocorreu devido ao fato dos pacientes apresentarem a mutação em heterozigose com mutações associadas a formas mais leves da doença (p.T500A no caso da família 2 e p.R201H nos pacientes da família 3).

Nesse trabalho a mutação p.R59H foi encontrada juntamente com a alteração IVS12+8T>C, sugerindo um haplótipo comum a essas famílias e diferente do encontrado nos pacientes estudados pelo grupo de Porto Alegre/RS.

5.2 Mutação p.F107L

A mutação p.F107L foi encontrada na família 7, no paciente e em sua mãe. Foi descrita por Hofer et al. (2010) em um paciente de origem grega, diagnosticado com gangliosidose GM1 forma juvenil aos dois anos de idade, esse

paciente apresentou a alteração em heterozigose com a mutação *frameshift* c.1342dupG, que leva a formação de um *stop* códon após 8 nucleotídeos. Na avaliação funcional, realizada pelo mesmo grupo, a atividade da enzima β -gal era de 1,2%.

Em nossa casuística a mutação foi encontrada em um paciente que apresentou os primeiros sintomas aos três anos, apresentando, portanto, a forma crônica da doença, com atividade residual da enzima de 2,9%. A diferença da atividade enzimática entre os pacientes pode ter ocorrido por nessa casuística existir a associação de duas mutações relacionadas à formas brandas da doença (p.F107L e p.L173P), enquanto no caso descrito por Hofer et al. (2010) a alteração c.1342dupG leva a uma atividade enzimática menor devido a formação de um *stop* códon.

5.3 Alteração inédita p.P152P

A alteração p.P152P trata-se de uma variação inédita encontrada em heterozigose na família 7, no paciente e em seu pai. A alteração foi pesquisada e não foi encontrada em grupo controle de 100 alelos, não aparentados e não afetados.

Durante a análise do genótipo do paciente da família 7 foram identificadas três alterações no gene *GLB1* (p.F107L, p.L173P e p.P152P), as mesmas foram procuradas em ambos genitores e foi possível observar que a mutação p.F107L é

de origem materna, p.P152P é de origem paterna e p.L173P não foi encontrada em nenhum dos pais.

O fato de p.P152P ser infrequente e estar presente no paciente e no pai depõe contra a possibilidade de paternidade ilegítima e reforça a ideia que p.L173P trata-se de mutação *de novo*.

5.4 Mutação p.L173P

No mesmo indivíduo da família 7, foi encontrada a mutação p.L173P. Essa mutação foi descrita por Santamaria et al. (2006), segregando juntamente com a alteração p.T500A em um paciente de origem espanhola diagnosticado com a doença de Morquio B. Em estudos funcionais foi descrita uma atividade enzimática de 1,8% (25, 47).

Hofer et al. (2010) descrevem os códon 173 e 500 do gene *GLB1* como fundamentais para doença de Morquio B, pois as mutações p.L173P e p.T500A foram encontradas em pacientes com atividade nula ou muito reduzida da enzima β -gal e apresentação clínica de Morquio B.

A p.L173P foi a primeira mutação descrita no éxon 5, porém no estudo funcional ela não foi relacionada à formação da EBP, o que poderia explicar o fenótipo mais leve apresentado pelos pacientes portadores dessa alteração (17).

No presente estudo a alteração não foi encontrada no pai do paciente, de modo que a interpretação foi de que se trata de uma mutação *de novo*. Esse tipo de alteração em doenças recessivas é raro, a probabilidade de ocorrer varia de 1 em 10^5 a 1 em 10^6 , mas pode ter acontecido devido ao fato de mutações ocorrerem frequentemente na formação dos gametas (48). Como a amostra analisada proveniente do pai compreende tecido somático (DNA extraído de leucócitos de sangue periférico), não é possível excluir a possibilidade de mosaïcismo em outra linhagem somática ou em células germinativas, o que teria repercussão no aconselhamento genético do casal.

5.5 Mutação p.R201H

A alteração p.R201H foi encontrada apenas na família 3, no par de irmãos e em seu pai. Foi descrita em homozigose por Kaye et al. (1997) em um paciente com a forma juvenil da gangliosidose GM1. Em 2010, Hofer et al. encontraram a mutação em um paciente de origem britânica e a associaram às formas juvenil e crônica, por apresentar uma maior atividade residual da enzima β -gal.

Essa mutação é conhecida por proteger os pacientes da forma mais grave da doença (7, 15, 17, 25 e 45), porque quando p.R201H está presente, associada a uma alteração grave ou não, o precursor da enzima é estável, ocorrendo a agregação com as outras enzimas do complexo formado pela β -gal, a neuraminidase e a PPCA, porém ele é rapidamente degradado (25). Em análise *in*

in vitro da enzima foi possível confirmar a hipótese de que a alteração p.R201H interfere menos na atividade catalítica da β -gal (32).

Essa alteração não afeta a formação da EBP apenas da β -galactosidase, o que contribui para a apresentação de formas mais leves da doença por pacientes com a mutação.

A atividade enzimática descrita foi de 2,5%. Conforme mencionado anteriormente, os valores de atividade enzimática residual foram de 4,2% na paciente 3a, e de 5,1% em seu irmão, paciente 3b.

5.6 Mutação p.G311R

A mutação p.G311R foi descrita por Moore et al. (2012) em uma paciente dos Estados Unidos na qual existia uma dúvida no diagnóstico entre gangliosidose GM1 forma crônica ou doença de Morquio B. Em análise *in silico* em sites de predição (*SIFT* e *PolyPhen*) a mutação foi considerada patogênica por estar localizada em uma região que codifica o sítio catalítico da enzima β -gal (34).

O aminoácido é também altamente conservado entre espécies e a troca de uma glicina por uma arginina pode provocar o enfraquecimento na formação do complexo enzimático (34).

Não há informação referente ao valor de atividade enzimática residual no único indivíduo no qual foi descrito. Na presente casuística, a atividade enzimática

foi 11,5% para a paciente da família 6, que apresentou essa mutação em heterozigose com a alteração p.T500A associada a formas mais leves da doença.

5.7 Alteração inédita p.I354S

A alteração nova p.I354S foi encontrada na família 8 dessa casuística em heterozigose com a mutação mais frequente p.T500A. A alteração foi analisada *in silico*, nos programas de predição *MutPred*, *PolyPhen 2*, *Snps&GO*, *SIFT*, *SNAP* e *Phd-SNP*. Com exceção do algoritmo *SNAP*, todos os *sites* de predição consideraram a mutação patogênica, relacionada ao fenótipo apresentado como demonstrado na tabela 5. O nível de atividade enzimática residual foi de 11,9% para a paciente da família 8.

5.8 Alteração inédita p.T384S

A alteração p.T384S foi encontrada apenas na família 1. Não há informações na literatura, pois se trata de uma alteração inédita, para a qual foi também realizada análise *in silico* nos *sites* de predição previamente citados.

O programa *MutPred*, que analisa a substituição da base nitrogenada de acordo com uma combinação de parâmetros funcionais e estruturais da enzima, considerou a alteração p.T384S com 40% de chance de ser patogênica. Os demais programas (*PolyPhen 2*, *Snps&GO*, *SIFT*, *SNAP* e *Phd-SNP*) consideraram a alteração benigna.

A paciente da família 1 apresentou p.T384S em heterozigose com a mutação p.T500A. O nível de atividade enzimática residual foi de 3,8%, correspondendo ao valor mais baixo na presente casuística, por essa razão acredita-se que a paciente apresente uma alteração intrônica distante que não foi possível identificar até o momento.

5.9 Polimorfismo IVS12+8T>C

O polimorfismo IVS12+8T>C localizado em sítio de *splicing* foi descrito pelo banco de dados *dbSNP* (rs13093698) com frequência de 15,8% e pode provocar uma pequena alteração no RNAm (RNA mensageiro) por estar localizado em região próxima ao sítio de *splicing*. Nessa casuística, esse polimorfismo foi encontrado juntamente com a mutação p.R59H, sendo tal combinação não descrita e presente em duas famílias, aparentemente não aparentadas entre si. Isso leva-nos a pensar que na realidade pode ser um único alelo derivado de ancestral comum, o que indicaria a possibilidade de efeito fundador nessa população estudada.

5.10 Mutação p.T500A

A mutação p.T500A foi encontrada em 40% dos alelos mutantes dos pacientes dessa casuística. Foi descrita em 2002 por Bagshaw et al. (49) em três pacientes (de duas famílias) com a doença de Morquio B, sendo dois irmãos gêmeos dizigóticos de origem portuguesa. Nesse caso a atividade enzimática foi

de 2,1%. No mesmo estudo Bagshaw et al. (2002) afirmaram que os pacientes com a mutação p.T500A apresentaram pequena quantidade das formas precursora (84kDa) e madura (64kDa) da enzima β -gal, a forma degradada com 45 kDa foi encontrada em maior quantidade. Isso indica que a enzima formada pelo gene com a mutação p.T500A não chega ao lisossomo sendo degradada no retículo endoplasmático.

Em 2009 Hofer et al. descreveram um paciente, de origem francesa, com a mutação p.T500A em heterozigose diagnosticado com doença de Morquio B e atividade enzimática de 1,3%. Santamaria et al. (2006 e 2007) descreveram dois pacientes com essa mutação juntamente com a alteração p.L173P, ambas em heterozigose, também com a doença de Morquio B e consideraram o códon 500 crucial para a doença, tanto quanto o códon 173, como discutido anteriormente.

Na presente casuística, a atividade enzimática variou de 3,8 a 11,9% em leucócitos, em sete dos 10 pacientes avaliados. Essa alteração foi encontrada em heterozigose em sete famílias estudadas (1, 2, 4, 5, 6, 8 e 9), não aparentadas, participantes dessa pesquisa. Em busca em banco de dados especializados não foi possível encontrar descrição da mutação em outros pacientes brasileiros, sendo assim a frequência da mutação p.T500A difere de outro grupo de pacientes estudados no Rio Grande do Sul, em que a mutação mais frequente foi a c.1722-1727insG (20, 50). Essa diferença pode ser explicada pela variação genética das regiões geográficas e porque o grupo de Porto Alegre estudou pacientes com

todas as formas da doença, mas principalmente com a forma infantil, enquanto essa casuística é composta por pacientes apenas com as formas juvenil e crônica.

Na família 5 foi encontrada apenas a mutação p.T500A e na família 1 apenas essa mutação pode ser considerada patogênica e relacionada ao fenótipo. Através de pesquisas em bancos de dados especializados foi possível considerar duas hipóteses. Primeiramente, pode ser que os pacientes tenham uma mutação intrônica distante que não foi possível encontrar até o momento. Além disso, Santamaria et al. (2007) descreveram um caso semelhante em que encontraram apenas uma mutação patogênica em heterozigose no paciente, por esse motivo analisaram as regiões intrônicas e perceberam que os íntrons que flanqueiam o éxon 5 tem grande concentração e variedade de sequências *Alu*.

Alu são sequências de 300pb conhecidos como *Short Interspersed Nuclear Elements (SINEs)* que estão presentes apenas em genomas de primatas e são compostos por dois monômeros com origem no gene 7SLRNA. Por estarem muito abundantes no genoma humano (aproximadamente 10%), por ter uma alta quantidade de C e G em sua composição e por serem sequências quase idênticas às *Alus* são regiões muito propensas a *cross over* desigual. Sempre que recombinações mediadas por *Alus* provocam rearranjos envolvendo sequências gênicas codificantes efeitos deletérios são esperados (51).

No caso descrito por Santamaria et al. (2007) ocorreu um *cross over* desigual no gene *GLB1* que ocasionou a deleção do éxon 5 do paciente em heterozigose.

Baseados nesse caso descrito mais testes serão realizados visando encontrar grandes deleções em heterozigose nos casos das famílias 1 e 5.

5.11 Inserção c.1717-1722insG

A inserção c.1717-1722insG foi encontrada em duas famílias estudadas. Essa alteração foi descrita em 1999 por Silva et al. em pacientes brasileiros. A mutação provoca um *frameshift* após o códon 524 em um *cluster* de 6 guaninas e termina a síntese da cadeia proteica, formando um *stop* códon após a incorporação de quatro aminoácidos diferentes (20).

Essa alteração é a mais frequente no Rio Grande do Sul (20, 50), onde 38,5% dos pacientes afetados nessas casuísticas apresentaram essa mutação. A frequência estimada dessa inserção na população normal de Porto Alegre é de 0,5% (50). Até o momento, essa alteração foi encontrada apenas em brasileiros e está relacionada com a forma infantil da doença e com pouca atividade da enzima β -gal.

Na presente amostra, a atividade enzimática residual foi de 10% para a paciente da família 4, e de 9,1% para o paciente da família 9, em ambos os casos a inserção foi encontrada em heterozigose com a mutação p.T500A. Como dito anteriormente, p.T500A está associada com a doença de Morquio B e em pacientes que apresentam atividade enzimática mais alta, por esse motivo apesar de ter a inserção que provoca a formação de uma proteína truncada os pacientes das famílias 4 e 9 têm maior atividade enzimática.



6. Conclusões

- A estratégia utilizada para o estudo molecular possibilitou a identificação de sete mutações causadoras de doença nas nove famílias estudadas.
- O presente trabalho contribui com a identificação de duas mutações inéditas e de uma alteração neutra p.P152P, adicionando dados à literatura especializada em gangliosidose GM1.
- Embora tenha havido predomínio da mutação p.T500A, presente em sete dos 17 alelos identificados, a diversidade de mutações indica que há uma grande heterogeneidade alélica para essa condição na população estudada.
- A ocorrência de mutação nova no gene *GLB1*, documentada em um dos casos, colaborou para o aumento da frequência gênica na população estudada.
- Por outro lado, o haplótipo determinado pela associação da mutação p.R59H com a IVS12+8T>C, além de ser inédita na literatura, indica a possibilidade de um efeito fundador na população estudada.
- Existe diferença genotípica entre a população estudada, composta de famílias procedentes da região de Campinas/SP e do sul do estado de MG, em comparação com a casuística da população do Rio Grande do Sul, sendo que em nos estados de São Paulo e Minas Gerais houve predomínio da mutação p.T500A e no Rio Grande do Sul o maior frequência é da inserção c.1722-1727insG. Não fica claro se essa diferença se deve, na

realidade, ao fenótipo clínico dos pacientes estudados, pois na primeira foi exclusivamente de pacientes com a forma juvenil e crônica, enquanto na segunda houve predomínio da forma infantil.



7. Referências

1. Cohn RM, Roth KS. *Catastrophic diseases presenting in the newborn period*. In: *Metabolic disease: a guide to early recognition*. Philadelphia: WB Saunders (1983).
2. El Hunsny AS, Fernandes-Caldato MC. *Inborn errors of metabolismo: literature review*. *Revista Paranaense de Medicina*. 2006, 20 (2): 41-45.
3. Ohto U, Usui K, Ochi T, Yuki K, Satow Y, Shimizu T. *Crystal structure of human β -galactosidase*. *The journal of biological chemistry*. 2011, 287 (3):1801-1812.
4. Saudubray JM, Charpentier C. *Clinical phenotypes: diagnosis/algorithms*. In: Scriver CR, Beaudet L, Sly WS, Valle D. *The metabolic and molecular bases of Inherited disease*, chapter 5, pp. 327-400, 1995.
5. Waber L. *Inborn errors of metabolism*. *Ped Ann*. 1990, 19(2): 105-117
6. Jeyakumar M, Thomas R, Elliot-Smith E, Smith DA, van der Spoel AC, d'Azzo A, Hugh-Perry V, Butters D, Dwek A, Platt FM. *Central nervous system in ammatation is a hallmark of pathogenesis in mouse models of GM1 and GM2 gangliosidosis*. *Brain*. 2003, 126:974-987.
7. Santamaria R, Blanco M, Chabás A, Grinberg D, Vilageliu L. *Identification of 14 novel GLB1 mutations, including five deletions, in 19 patients with GM1 gangliosidosis from South America*. *Clin Genet*. 2007, 71:273-9.
8. Balestrin RC, Baldo G, Vieira MB, Sano R, Coelho JC, Giugliani R, Matte U. *Transient high-level expression of β -galactose after transfection of fibroblastos*

from GM1 gangliosidosis patients with plasmid DNA. Brazilian Journal of Medical and Biological Research. 2008, 41:283-288.

9. Kaye E, Shalish C, Livermore J, Taylor HA, Stevenson R, Breakfield X. *β -galactosidase gene mutations in patients with slowly progressive GM1 gangliosidosis*. Journal of child neurology. 1997, 12(4): 242-247

10. Yang CF, Wu JY, Tsai FJ. *Three novel beta-galactosidase gene mutations in Han Chinese patients with GM1 gangliosidosis are correlated with disease severity*. Journal of Biomedical Science. 2010, 17(1):79-86.

11. Brunetti-Pierri N, Scaglia F. *GM1 gangliosidosis: Review of clinical, molecular, and therapeutic aspects*. Molecular Genetics and Metabolism. 2008, 94:391-6.

12. Yoshida K, Oshima A, Shimmoto M, Fukuhara Y, Sakuraba H, Yanagisawa N, Suzuki Y. *Humam β -galactosidase gene mutation in GM1-gangliosidosis: a common mutation among japanese adult/chronic cases*. Am J Hum Gent. 1991, 49:435-442.

13. Hofer D, Paul K, Fantur K, Beck M, Bürger F, Caillaud C, Fumic K, Ledvinova J, Lugowska A, Michelakakis H, Radeva B, Ramaswani U, Plecko B, Paschke E. *GM1 gangliosidosis and Morquio B disease: expression analysis of missense mutations affecting the catalytic site of acid β -galactosidase*. Humam Mutation. 2009, 30(8):1214-1221.

14. Hinek A, Zhang S, Smith AC, Callahan JW. *Impaired elastic-fiber assembly by fibroblasts from patients with either Morquio B disease or infantile GM1-*

gangliosidosis is linked to deficiency in the 67-kD spliced variant of β -galactosidase. Am J Hum Genet. 2000, 67: 23-36.

15. Caciotti A, Donati MA, Boneh A, d'Azzo A, Federico A, Parini R, Antuzzi D, Bardelli T, Nosi D, Kimonis V, Zammarchi E, Morrone A. *Role of β -galactosidase and elastin binding protein in lysosomal and nonlysosomal complexes of patients with GM1-gangliosidosis.* Humam Mutation. 2005, 25:285-292.

16. Caciotti A, Bardelli T, Zammarchi E, Morrone A, Cunningham J, d'Azzo A. *Modulating of the new polymorphism L436F detected in the GLB1 gene of a type-II GM1 gangliosidosis patient.* Hum Genet. 2003, 113:44-50.

17. Santamaria A, Chabás A, Coll MJ, Miranda CS, Vilageliu V, Grinberg D. *Twenty-one novel mutations in the GLB1 gene indentified in a large group of GM1-gangliosidosis and Morquio B patients: possible commom origin for the prevalent p.R59H mutation among gypsies.* Humam Mutation. 2006, 922:1-11.

18. Suzuki Y, Sakuraba H, Oshima A. *β -galactosidase deficiency (β -galactosidosis): GM1 gangliosidosis and Morquio B disease.* In: The metabolic and molecular bases of inherited disease. Chapter 90, pp: 2785-2823.

19. Hachiya Y, Hayashi M. *An 11-year-old boy showing rapid psychomotor regression and diffuse cerebral white matter lesions.* Neuropathology. 2009, 29: 517-519.

20. Silva CMD, Severini MH, Sopelsa A, Coelho JC, Zaha A, d'Azzo A, Giuliani R. *Six novel β -galactosidase gene mutations in brazilian patients with GM1-gangliosidosis*. Humam Mutation. 1999, 13:401-9.
21. Sinigerska I, Chandler D, Vaghjiani V, Hassanova I, Gooding R, Morrone A, Kremensky I, Kalaydjieva L. *Founder mutation causing infantile GM1-gangliosidosis in the gypsy population*. Molecular Genetics and Metabolism. 2006, 88:93-95.
22. Callahan JW. Molecular basis of GM1 gangliosidosis and Morquio disease, type B. *Structure-function studies of lysosomal β -galactosidase and the non-lysosomal β -galactosidase-like protein*. Biochimica et Biophysica Acta. 1999, 1455:85-103.
23. Caciotti A, Guerrini R, Donati MA, d'Azzo A, Salvioli R, Zammarchi E, Morrone A. *The potencial action of galatose as a "chemical chaperone": increase of beta galactosidase activity in fibroblasts from an adult GM1-gabgliosidosis patient*. European Journal of Paediatric Neurology. 2009, 13:160-164.
24. Giugliani R, Jackson M, Skinner SJ, Vimal CM, Fensom AH, Fahmy N, Sjövall A, Benson PF. Progressive mental regression in siblings with Morquio disease type B (mucopolysaccharidosis IV B). Clin Genet. 1987 Nov, 32(5):313-325.
25. Hofer D, Paul K, Fantur K, Beck M, Roubergue A, Vellodi A, Poorthuis BJ, Michelakakis H, Plecko B, Paschke E. *Phenotype determining alleles in GM1*

gangliosidosis patients bearing novel GLB1 mutations. Clin Genet 2010; 78: 236–246.

26. Mocchetti I. *Exogenous gangliosides, neuronal plasticity and repair, and the neurotrophins*. Cell Mol Life Sci. 2005: 2283-2294

27. Ledeen RW, Yu RK. *Gangliosides: structure, isolation, and analysis*. Methods Enzymol 83:139-191, 1982.

28. Hallgren P, Lundbland A. *Structural analysis of oligosaccharides isolated from the urine of a blood group A, secretor, woman during pregnancy and lactation*. The journal of biological chemistry. 1977, 252(3): 1023-1033.

29. Hakomori S. *Bifunctional role of glycosphingolipids*. The journal of biological chemistry. 1990, 255(31): 18713-18716.

30. Rahmann H. *Brain gangliosides and memory formation*. Behavioural brain research. 1995, 66: 105-116.

31. D'Azzo A, Hoogeveen A, Reuser AJJ, Robinson D, Galjaard H. *Molecular defect in combined β -galactosidase and neuraminidase deficiency in man*. Biochemistry. 1982, 79: 4535-4539.

32. Caciotti A, Bardelli T, Donati MA, d'Azzo A, Massai G, Luciani L, Zammarchi E, Morrone A. *Primary and secondary elastin-binding-protein defect leads to impaired elastogenesis in fibroblasts from GM1 gangliosidosis patients*. American Journal of Pathology. 2005, 167: 1989-1698.

33. Sperb F, Vairo F, Burin M, Mayer FQ, Matte U, Giugliani R. *Genotypic and phenotypic characterization of Brazilian patients with GM1 gangliosidosis*. *Gene*. 2013, 512:113-116.
34. Moore T, Bemstein JA, Casson-Parkin S, Cowan TM. *B-galactosidosis in patient with intermediate GM1 and MBD phenotype*. *JIMD Reports*. DOI 10.1007/8904_2012_145.
35. Sambrook J, Fritsch EF, Maniats T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2nd ed. NY: Cold Spring Harbor Laboratory, Press. 1989; 1659.
36. Don RH, Cox PT, Wainwright BJ, Baker K, Mattick JS. *Touchdown PCR to circumvent spurious priming during gene amplification*. *Nucleic Acids Res*. 1991, 19: 4008
37. The Ensembl Project Database. <<http://www.ensembl.org>> Acessado em 19.05.2013.
38. Human Gene Mutation Database. <<http://www.hgmd.cf.ac.uk>> Acessado em 28.05.2013.
39. Li B, Krishnan VG, Mort ME, Xin F, Kamati KK, Cooper DN, Mooney SD, Radivojac P. *Automated inference of molecular mechanisms of disease from amino acid substitutions*. *Bioinformatics*. 2009, 25:2744–2750.
40. Ramensky V, Bork P, Sunyaev S. *Human non-synonymous SNPs: server and survey*. *Nucleic Acids Res*. 2002, 30:3894–3900.

41. Calabrese R, Capriotti E, Fariselli P, Martelli PL, Casadio R. *Functional annotations improve the predictive score of human disease-related mutations in proteins*. Hum Mutat. 2009, 30:1237–1244.
42. Kumar P, Henikoff S, Ng PC. *Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm*. Nat Protoc. 2009;4(7):1073-81
43. Bromberg Y, Rost B. *SNAP: predict effect of non-synonymous polymorphisms on function*. Nucleic Acids Res. 2007, 35:3823–3835.
44. Capriotti E, Calabrese R, Casadio R. *Predicting the insurgence of human genetic diseases associated to single point protein mutations with support vector machines and evolutionary information*. Bioinformatics. 2006, 22:2729–2734.
45. Morrone A, Bardelli T, Donati MA, Giorgi M, Di Rocco M, Gatti R, Parini R, Ricci R, Taddeucci G, D’Azzo A, Zammarchi E. *β -galactosidase gene mutations affecting the lysosomal enzyme and the elastin-binding protein in GM1-gangliosidosis patients with cardiac involvement*. Humam mutation. 2000, 15: 354-366.
46. Morrone A, Bardelli T, Donati MA, Giorgi M, Di Rocco R, Gatti. R, Taddeucci G, Ricci R, d’Azzo A and Zammarchi E. *Identification of new mutations in six Italian patients affected by a variant form of infantile GM1 gangliosidosis with severe cardiomiopathy*. Am J Hum Genet. 1997, 61:A528.

47. Santamaria R, Chabas A, Callahan JW, Grinberg D, Vilageliu L. *Expression and characterization of 14 GLB1 mutant alleles found in GM1-gangliosidosis and Morquio B patients*. Journal of Lipid Research. 2007, 48: 2275-2282.
48. Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF. *Thompson & Thompson Genética Médica*. Elsevier, capítulo 5, pp. 61-88
49. Bagshaw RD, Zhang S, Hinek A, Skomorowski M, Whelan D, Clarke JTR, Callahan JW. *Novel mutations (Asn 484 Lys, Thr 500 Ala, Gly 438 Glu) in Morquio B disease*. Biochimica et Biophysica Acta. 2002, 1588: 247-253.
50. Baiotto C, Sperb F, Matte U, Silva CD, Sano R, Coelho JC, Giugliani R. *Population analysis of the GLB1 gene in South Brazil*. Genetics and Molecular Biology. 2011, 34(1): 45-48.
51. Teixeira-Silva A, Silva RM, Carneiro J, Amorim A, Azevedo L. *The role of recombination in the origin and evolution of Alu subfamilies*. Plos one. 2013, 8(6):1-8.



8. Anexo



CEP, 26/04/11
(Grupo II)

PARECER CEP: Nº 236/2011 (Este nº deve ser citado nas correspondências referente a este projeto).
CAAE: 0179.0.146.000-11

I - IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: “ANÁLISE DE MUTAÇÕES NO GENE GLB1 E EXPRESSÃO DA ENZIMA β -GALACTOSIDASE EM PACIENTES COM GANGLIOSIDOSE GM1”.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Marcella Bergamini de Baptista

INSTITUIÇÃO: Hospital das Clínicas/UNICAMP

APRESENTAÇÃO AO CEP: 07/04/2011

APRESENTAR RELATÓRIO EM: 26/04/12 (O formulário encontra-se no *site* acima).

II – OBJETIVOS.

Caracterização molecular dos portadores de gangliosidose GM1, nas formas juvenil e crônica, atendidos no ambulatório citado no campo 4.

III – SUMÁRIO.

Tese de Mestrado. Glangliosidose GM1 é uma doença autossômica recessiva rara, apresentada em três níveis de sintomas e severidade; é provocada por uma deficiência da enzima beta-galactosidase que leva ao acúmulo do gangliosideo GM1, entre outros compostos. A proposta do estudo é caracterizar as mutações do gene codificador da enzima numa amostra de portadores de gangliosidose nas formas juvenil e crônica, atendidos no Ambulatório de Erros Inatos do Metabolismo-HC. Serão utilizadas as técnicas de PCR, seqüenciamento automático, PCR em tempo real e Western blott para a análise do material genético, que será colhido através de punção venosa de veia periférica, por profissional habilitado. Serão estudados os portadores da disfunção metalólica, assim como seus pais, totalizando 30 sujeitos de pesquisa. Há previsão de armazenamento do material biológico, desde que mediante autorização dos sujeitos. Os autores anexaram documento sobre regimento do Banco de Material Biológico Humano do laboratório de genética molecular, FCM, Unicamp.

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES.

Projeto bem elaborado em todos os seus itens. O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido esta adequadamente elaborado, no qual o sujeito poderá autorizar ou não a guarda de seu material biológico. Em caso positivo, o material será armazenado em laboratório que possui autorização do CEP para tal finalidade.



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, o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, bem como todos os anexos incluídos na pesquisa supracitada.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES.

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e).

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

VII – DATA DA REUNIÃO.

Homologado na IV Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 26 de abril de 2011.

Carmen Silvia Bertuzzo
Profa. Dra. Carmen Silvia Bertuzzo
VICE-PRESIDENTE do COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP



9. Apêndice

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Título do Projeto: Análise de mutações no gene *GLB1* e expressão da enzima β -galactosidase em pacientes com gangliosidose GM1.

Responsáveis: Marcella Bergamini de Baptista e Prof. Dr. Carlos Eduardo Steiner

Justificativa e objetivo da pesquisa

A gangliosidose GM1 é uma doença rara causada por mutações no gene *GLB1*. O projeto tem como objetivo procurar mutações nesse gene nos pacientes com essa doença e seus familiares.

Procedimentos, riscos e desconfortos

O estudo do gene será feito no laboratório a partir de amostras de sangue colhidas durante a consulta médica de rotina no ambulatório.

A coleta das amostras de sangue será feita a partir de punção de veia periférica, por profissional habilitado (médico, enfermeira ou biomédico). Os desconfortos possíveis são dor, inchaço e pequenos hematomas na região, que desaparecem em poucos dias. Não será realizado nenhum outro procedimento na própria pessoa além dos descritos acima.

Benefícios

A identificação das mutações poderá ser usada para o aconselhamento genético do paciente e dos familiares próximos.

Sigilo

As informações sobre os pacientes serão mantidas em sigilo, os resultados de exames e testes serão fornecidos apenas durante consulta médica, se utilizadas em congressos e publicações serão excluídos os nomes dos pacientes.

Recusa ou descontinuação da participação

Garante-se ao paciente a liberdade de recusa em participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa sem prejudicar ou modificar o seu atendimento e acompanhamento no HC/Unicamp.

A participação na pesquisa é de forma voluntária, ou seja, sem remuneração financeira e sem ressarcimento, pois não existirão gastos por parte dos pacientes.

Esclarecimentos

Garante-se aos pacientes participantes qualquer tipo de esclarecimento em caso de dúvida ou informação adicional antes, durante e após a realização da pesquisa, podendo ser fornecidos pela pesquisadora responsável.

Nome: Marcella Bergamini de Baptista

Local de trabalho: Departamento de Genética Médica – FCM – Unicamp

Tel: (19) 3521- 8902

Em caso de recursos, dúvidas ou reclamações referentes aos aspectos éticos, entrar em contato com a secretaria do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Ciências Médicas-Unicamp. Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126 - Caixa Postal 6111 13083-887 Campinas – SP. Fone (019) 3521-8936 Fax (019) 3521-7187 e-mail: cep@fcm.unicamp.br

Armazenamento de material biológico

Fui informado que poderei autorizar que esse material genético seja guardado no Banco de Material Biológico do Laboratório de Genética Molecular/FCM/Unicamp. Caso

este material venha a ser útil para outros estudos aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa, estou ciente que serei informado para que autorize ou não o uso da(s) amostra(s).

Autorizo o armazenamento do material obtido de minha pessoa ou da pessoa sob minha responsabilidade legal.

NÃO Autorizo o armazenamento do material obtido de minha pessoa ou da pessoa sob minha responsabilidade legal.

Após ter lido, esclarecido minhas dúvidas e compreendido totalmente o processo da pesquisa, assino este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Nome do(a) paciente: _____

Assinatura do(a) participante ou nome e assinatura do responsável legal, se for o caso:

Responsabilidade do Pesquisador

Asseguro ter explicado, e fornecido uma cópia deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido a _____, responsável por si próprio/pelo menor _____.

Pesquisador

Data: ___/___/___