

BC/30955
IB/80353



UNICAMP

GENÉTICA MOLECULAR DA DOENÇA DE KRABBE

EDI LÚCIA SARTORATO

Tese de doutoramento

-Campinas, SP-

1997

T/Unicamp

Sa77_g



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS - UNICAMP
INSTITUTO DE BIOLOGIA
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA MÉDICA

GENÉTICA MOLECULAR DA DOENÇA DE KRABBE

EDI LÚCIA SARTORATO

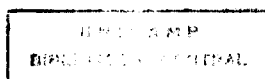
ORIENTADOR: Profa. Dra. Solange Bento Farah Kooke

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato(a)
Edi Lúcia Sartorato
e aprovada pela Comissão Julgadora.

11/04/97
Solange Farah Kooke

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da
Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)
para a obtenção do título de doutor em Ciências
Biológicas, área de concentração Genética.

Campinas
1997



UNIDADE	IB
N.º CHAMADA:	7/UNICAMP
	Sa77g
V. E.A.	
T. M3D BC/	30955
PROC.	28.197
C ☐ D ☒	
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	02/04/97
N.º CPD	0.000.0885.6

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP**

Sartorato, Edi Lúcia
Sa77g Genética molecular da doença de Krabbe/ Edi Lúcia
Sartorato. -- Campinas, SP:[s.n.], 1997.
88f:ilus.

Orientadora: Solange Bento Farah Kooke
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas,
Instituto de Biologia.

1- Sistema nervoso - degeneração. 2. Mielina.
3. Genética molecular. I. Kooke, Solange Bento Farah.
II. Universidade Estadual de Campinas, Instituto de
Biologia. III. Título.

Campinas, 11 de abril de 1997.

BANCA EXAMINADORA:

TITULARES:


Prof. Dra. Solange Bento Farah
(orientadora)


Prof. Dr. Edwin Henry Kolodny


Prof. Dr. Roberto Giugliane


Prof. Dr. Danilo Moretti Ferreira


Prof. Dra. Christine Hackel

SUPLENTE:

Prof. Dra. Antonia Paula Marques de Faria

Prof. Dra. Denise Yvonne Janovitz Norato

Em relação a todos os atos de iniciativa e criação existe uma verdade fundamental cujo desconhecimento mata inúmeras idéias e planos esplêndidos: a de que no momento em que nos comprometemos a Providência move-se também.

Toda uma corrente de acontecimentos brota da decisão, fazendo surgir a nosso favor uma série de incidentes e encontros e assistência material que nenhum homem sonharia que viesse em sua direção.

O que quer que você possa fazer, ou sonha que possa fazer, faça.

Coragem contém genialidade, poder e magia.

Goethe

ao **Alejandro** e
à minha filha,
Luna

Agradecimentos

Profa. Dra. Solange Bento Farah Kooke - é verdade que “o que amamos é sempre um símbolo” mas, você representa mais do que isso na minha vida, uma pessoa fantástica que meu reflexo tenta imitar, só que com a mão esquerda.

Profa. Dra. Christine Hackel - ...“a experiência da amizade parece ter suas raízes fora do tempo, na eternidade”...a grande admiração profissional que sinto por você Chris comunga com o enorme carinho que sinto por sua pessoa, abrigada por sua amizade.

Dr. Edwin H. Kolodny - por gentilmente ter cedido o material deste estudo, pela oportunidade profissional, pela confiança e ajuda em todos os sentidos.

Dr. Miguel Angel Gama Sosa e Dra. Rita De Gaspari - por tudo que me ensinaram e pelo apoio científico e pessoal em todos os instantes.

Prof. Dr. Danilo Moretti Ferreira - pela oportunidade, confiança e amizade, e compreensão nas horas mais difíceis.

Prof. Dr. Roberto Giugliane - pela contribuição científica e profissional.

Profa. Dra. Denise I. Y. Norato - pela força e importante colaboração científica.

Profa. Dra. Antonia Paula Marques de Faria - pela importante colaboração profissional, pela paciência e gentileza na pré-banca deste trabalho e pelo carinho que sempre senti na sua pessoa.

Profa. Dra. Laura Maria Mariscal Ottoboni - pela amizade e ajuda profissional.

Prof. Dr. Bernardo Beiguelman - pelo apoio que sempre encontrei e pela imensa admiração que sinto por sua pessoa.

Prof. Dr. Walter Pinto Jr. - pela confiança e grande ajuda em muitos momentos da minha vida pessoal e profissional.

Profa. Dr. Maricilda Pallandi de Mello - pela amizade e carinho sempre presentes, minha admiração pela sua seriedade profissional e impecável caráter.

Ao Sr. Luís Cesar Fernandes e família - pela oportunidade, pela grande contribuição que vem empregando no desenvolvimento científico e tecnológico de seu país.

Ao pessoal do Departamento de Neurologia da New York University, Dr. Srinivasa Raghavan, Dra. Esther Leshinsky, Dr. Stanley Samuels, Jamal Smalls, Dr. Zhao-Hui Wang, Ms. Michelle Butler e Ms. Pat Stewart.

À amiga Dra. Stefannie Tzall, sempre gentil e carinhosa.

Aos professores do Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG), Unicamp.

Aos professores do Departamento de Genética Médica, FCM, Unicamp.

Aos funcionários, alunos, estagiários e residentes do Departamento de Genética Médica, FCM, Unicamp.

Aos funcionários, alunos e estagiários do Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética, CBMEG, Unicamp.

À diretoria da Faculdade de Ciências Médicas, Unicamp.

À Fundação para o Desenvolvimento da Unesp, FUNDUNESP, pelo suporte financeiro.

À super Teresa, secretária da sub-comissão da Pós-graduação em Genética, IB, Unicamp.

Ao pessoal do Laboratório de Genética Humana, que estiveram comigo todo este tempo, primeiro por e-mail e depois dividindo alegrias e ansiedades diárias, em especial à Madá, amigona do peito.

Agradecimentos especiais

Alê - esse trabalho é humildemente dedicado à voce, pelo amor, companheirismo, amizade, compreensão, tudo...tudo...sem você eu não conseguiria - te quero muito.

Aos meus pais e meus irmãos, e o resto da turma lá de casa - família que como todas não é perfeita, mas que sempre está nas horas difíceis.

Jane, você é aquela amiga “debaixo d’água”, sei que nem preciso dizer o que gostaria porque você já sabe tudo, mora aqui do lado...

*Aos meus amigos, eles sabem quem são...*mas, é preciso aqui em “voz alta” dizer de três pessoas, que estão sempre perto e são passado, presente e futuro na minha vida, as “*três graças*”: Ercília, Clélia e Renata, amigas... super obrigado!

Abreviaturas

°C - graus Celsius
μg - micrograma
μl - microlitro
ASOH - hibridização oligonucleotídeo alelo- específico (*alelo-specific oligonucleotide hybridization*)
Amp - ampicilina
TMO - transplante de medula óssea
bp - pares de base
CAT - gene que codifica a enzima cloranfenicol acetil transferase
cDNA - ácido desoxiribonucleico complementar
ddNTPs - didesoxinucleotídeos trifosfatos
DNA - ácido desoxiribonucleico
dNTPs - desoxiribonucleotídeos trifosfatos
del - deleção
DTT - ditioteirol
EDTA - ácido etilenodiaminotetracético
EMBL - European Molecular Biology Laboratory
GALC - galactosilcerebrosidase (galactosilceramídeo β-galactosidase)
g - grama
GenBank - Genetic Sequence Data Bank
kb - quilobase
l - litro
LB - meio de cultura Luria-Bertani
M - molaridade
Mb - megabase
MDE - *Mutation Detection Enhancement*
mg/ml - miligramas por mililitro
ml - mililitro
N - normalidade
ng - nanogramas
nm - nanômetros
ORF - cadeia aberta de leitura de aminoácidos
PCR - reação em cadeia da polimerase (*polymerase chain reaction*)
q.s.p. - quantidade suficiente para
RNA - ácido ribonucleico
rpm - rotações por minuto
SSCP - polimorfismo da conformação da simples fita (*single-strand conformation polymorphism*)
SDS - dodecil sulfato de sódio
STE - sódio/tris/EDTA
TAE - tris/ácido acético/EDTA
TBE - tris/ácido bórico/EDTA
TE - tris-EDTA
TEMED - N, N, N', N'- tetrametiletilenodiamina
Tris - tris-(hidroximetil)-aminometano
UV - ultra-violeta
X-gal - 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosídeo

INTRODUÇÃO.....	1
Histórico	1
Aspectos clínicos	3
Forma Clássica.....	3
Formas tardias	4
Bioquímica.....	5
Histopatologia	8
Genética Molecular.....	9
Diagnóstico e tratamento	16
OBJETIVOS	19
MATERIAL E MÉTODOS	20
I - CASUÍSTICA	20
II - MÉTODOS	22
A - Estratégia utilizada.....	22
B - Descrição dos métodos	25
1 - Extração de DNA de sangue periférico.....	25
2 - Isolamento de mRNA	25
3 - Análise de mutações no cDNA.....	26
a) Amplificações.....	26
a.1) Amplificação do cDNA: RT-PCR (<i>reverse transcriptase-PCR</i>)	26
a.2) Amplificação dos fragmentos de cDNA: PCR.....	28
a.3) Amplificação de todaa região codificante: PCR longo (<i>extra long PCR</i>)	29
a.4) Amplificação do transcrito menor.....	30
b) Clonagem e sequenciamento.....	31
b.1) Clonagem no vetor pCRII	31
b.2) Sequenciamento	33

4 - Detecção de mutações por SSCP (<i>single-strand conformation polymorphism</i>)	33
a) PCR para análise por SSCP	34
b) Digestão dos produtos de PCR	34
c) Preparação do gel	35
5 - Determinação no DNA genômico da condição das mutações encontradas em cDNA	35
a) Análise de restrição	37
b) Hibridização com oligonucleotídeo alelo-específico (ASOH)	37
c) Sequenciamento do DNA genômico	38
6 - Análise de alterações no gene previamente descritas	38
a) Polimorfismo C ⁵⁰² →T	38
b) Polimorfismo T ¹⁶³⁷ →C	39
c) Análise da deleção	40
d) Análise do polimorfismo associado à deleção C ⁵⁰² →T/del	41
e) Análise do nível de expressão	41
RESULTADOS	42
1 - Alterações encontradas	42
2 - Resumo das alterações encontradas em cada indivíduo	43
3 - Análise das alterações no gene da GALC	46
4 - Análise do polimorfismo C ⁵⁰² →T	50
5 - Análise da deleção	51
6 - Análise do transcrito menor	52
7 - Estudo das famílias	53
a) Família 1	53
b) Família 2	55
c) Família 3	56
d) Família 4	57
e) Família 5	58
f) Família 6	59
g) Família 7	61
h) Família 8	65
8 - Indivíduos submetidos à transplante de medula óssea	66

DISCUSSÃO.....	68
Alterações encontradas no gene.....	69
Os polimorfismos.....	75
Indivíduos submetidos à transplante de medula óssea.....	74
CONCLUSÃO	76
RESUMO.....	77
ABSTRACT.	78
BIBLIOGRAFIA.....	79

Histórico

A leucodistrofia por células globóides, ou doença de Krabbe, é uma condição geneticamente determinada, transmitida de forma autossômica recessiva. Apesar de sua incidência baixa, acomete diferentes raças e sua distribuição geográfica é global. A denominação de doença de Krabbe deve-se ao fato de ter sido descrita, inicialmente, pelo neurologista dinamarquês Knud Krabbe, em 1916. A partir da observação clínica de dois irmãos que vieram a óbito com quadro neurológico sugestivo de esclerose difusa e aguda no cérebro, e dos exames histopatológicos, que identificaram células anormais na substância branca, Krabbe delineou os principais aspectos clínicos dessa doença, ressaltando ainda seu caráter familiar e curso rápido.

O termo globóide, introduzido mais tarde por Collier e Greenfield (1924), descreve a presença de numerosos macrófagos anormais, as chamadas células globóides, na substância branca (Collier & Greenfield, 1924). Já o termo leucodistrofia é aplicado às doenças hereditárias nas quais há um comprometimento difuso da substância branca do sistema nervoso sem reação inflamatória (Greenfield *et al.*, 1933). Assim, por essas características histopatológicas peculiares, é que surgiu a denominação leucodistrofia por células globóides.

Em 1963, Austin isolou uma fração de células globóides e encontrou alta concentração de uma substância identificada como galactosilceramídeo. A injeção desse galactosilceramídeo em cérebros de camundongos, levou à formação de células globóides idênticas às encontradas em humanos (Austin, 1963). Em 1970, demonstrou-se que a enzima galactosilcerebrosidase (galactosilceramídeo β -galactosidase) é deficiente nos indivíduos com a doença de Krabbe (Suzuki & Suzuki, 1970). Portanto, as células globóides nada mais são que os macrófagos modificados pela reação ao galactosilceramídeo, que não pode ser hidrolizado devido à deficiência na atividade da enzima lisossômica galactosilcerebrosidase, a qual degrada o galactosilceramídeo a ceramídeo e galactose.

A doença de Krabbe também já foi observada em diversas espécies animais, sendo que o primeiro modelo animal foi descrito em cães, por Frankhauser em 1963 (Frankhauser *et al.*, 1963). Estudos em camundongos mutantes tipo *twitcher*, descobertos em 1976, e que representam um autêntico modelo da doença de Krabbe humana possibilitaram grandes avanços no estudo da doença, pelas vantagens experimentais do uso desses animais em laboratório.

Os estudos moleculares que, certamente, permitirão uma melhor compreensão do gene responsável pela doença de Krabbe, bem como de sua variabilidade clínica estão, entretanto, apenas no início. Em 1989, o gene que codifica a enzima galactosilcerebrosidase, foi mapeado no cromossomo 17, utilizando células híbridas de camundongo do tipo *twitcher* e fibroblastos humanos (Lyerla *et al.*, 1989). Posteriormente, a localização correta foi determinada, por análise de ligação, no cromossomo 14 (Oehlmann, *et al.*, 1993). Após a identificação do gene, a localização ficou restrita à região 14q31, por técnica de hibridização *in situ* (Cannizzaro, *et al.*, 1994).

Em 1993, a galactosilcerebrosidase foi extraída da urina de indivíduos normais, purificada e parcialmente caracterizada (Chen & Weng, 1993). Nesse mesmo ano foi possível a clonagem do gene, realizada, concomitantemente, por dois grupos de pesquisadores (Chen *et al.*, 1993; Sakai *et al.*, 1994).

O gene tem 17 exons, dentro de uma região de 60 kb, e uma região promotora do tipo GC, similar a outros genes de proteínas lisossômicas. Algumas mutações já foram descritas, assim como uma importante deleção com uma extensão de 30 kb e perda dos exons 11 a 17. Essa mesma deleção está associada ao polimorfismo C→T na posição 502 do cDNA, resultando na troca do aminoácido arginina por cisteína. O genótipo C⁵⁰²→T/del, ou seja, a base C para T na posição 502 associada a deleção após o exon 10, é o mais comum em pacientes afetados pela doença de Krabbe, predominando entre os oriundos no norte da Europa (Luzi *et al.*, 1995a; Rafi *et al.*, 1995).

Aspectos clínicos

A doença de Krabbe é uma doença fatal e de progressão rápida. A forma mais conhecida é a infantil grave que se inicia entre os 3 e 6 meses de idade, raramente ultrapassando o segundo ano de vida. Entretanto, formas tardias e atípicas, denominadas, em geral, como leucodistrofias, têm sido observadas.

As formas da doença dependem, sobretudo, da idade de início. Embora as formas não clássicas apresentem certa heterogeneidade clínica, alguns autores sugeriram os tipos clínicos especificados na tabela 1.

Tabela 1 - Classificação clínica da doença de Krabbe.

Forma clínica	Idade de início da doença	Duração da doença
Infantil clássica	4 - 6 meses	< 1 ano
Infantil tardia	6 meses - 3 anos	1 - 3 anos
Juvenil	3 - 10 anos	> 5 anos
Adulta	10 - 35 anos	2 - 5 anos

(Suzuki *et al.*, 1995)

Forma clássica

A forma infantil ou clássica, corresponde àquela originalmente observada por Krabbe, em 1916. Pela rápida progressão da doença, Hagberg (1963) dividiu o curso clínico em três estágios. O primeiro estágio é caracterizado por irritabilidade exagerada, espasticidade de membros e febres de origem inexplicada. A criança, aparentemente normal nos primeiros meses após o nascimento, torna-se sensível ao estímulo tátil, auditivo e visual, chora freqüentemente, vomita e se alimenta com dificuldade, podendo manifestar convulsões. Há retardamento do desenvolvimento neuropsicomotor e já aparece um aumento de proteínas no líquido céfalo-raquidiano. No segundo estágio, ocorre grave deterioração motora e mental, de instalação rápida, com hipertonidade e abolição de reflexos profundos em decorrência da neuropatia periférica subjacente, além dos reflexos tendinosos hiperativos. Surgem também convulsões generalizadas e são comuns a atrofia óptica e a lenta reação pupilar à luz. No último estágio, que pode durar semanas ou meses, a criança mergulha em um estado vegetativo, perdendo o contato com o mundo exterior. Cegueira e surdez podem ocorrer. A morte, em geral, sobrevém de quadro infeccioso, acontecendo em menos de dois anos. Os sintomas e sinais são praticamente restritos ao sistema nervoso central, com a descrição de neuropatia periférica, em especial nos primeiros estágios, sem evidências de comprometimento dos demais sistemas.

Não há distribuição geográfica precisa para a forma infantil clássica. Sua incidência na população geral é desconhecida, mas sabe-se que é elevada no norte da Europa (Rafi *et al.*, 1995) e nos países escandinavos (Hagberg *et al.*, 1970), sendo que, na Suécia, a incidência é estimada em 1 para 25.000. Entre 1972 e 1986, no Japão, por meio de diagnósticos enzimáticos, a incidência foi estimada em 1 para 100.000-200.000 recém-nascidos, semelhante a de 1 para 150.000 verificada na França (Suzuki *et al.*, 1995).

Formas tardias

Em linhas gerais, nas formas tardias a doença evolui da mesma maneira e com a mesma sucessão de sintomas e sinais da forma infantil. Contudo, diferenciando-se dessa, alguns casos se mostraram altamente variáveis e contrariando as previsões, com sintomas diversos e, algumas vezes, manifestações atípicas, possivelmente devido à fatores exógenos.

A classificação clínica da doença de Krabbe é controvertida sendo que, alguns autores consideram como forma tardia os quadros que surgem após o início da marcha, entre os 15 meses e 10 anos e, em sua grande maioria, antes dos 5 anos de idade. Sendo assim, a forma infantil tardia também estaria nesse grupo (Grewal *et al.*, 1991; Verdrú *et al.*, 1990). Não há significativa diferença na sintomatologia das formas infantil tardia e juvenil. Na forma adulta, o quadro é variado, sendo poucos os casos descritos. Nas formas tardias, dificuldade progressiva na marcha ou um leve retardamento são, geralmente, os primeiros sinais apresentados pela doença. A evidência de uma neuropatia vai se tornando mais óbvia com a idade. Os sinais de demência aparecem progressivamente e, em geral, algum tempo depois das alterações motoras, enquanto outros pacientes, mantêm a inteligência normal por muitos anos.

Muitos pacientes com doença de Krabbe foram diagnosticados no passado como possuindo doença de Schilder, a qual também determina um outro tipo de esclerose difusa, sendo que o diagnóstico diferencial se baseava apenas na análise histológica. Entretanto, atualmente, pela possibilidade de melhor definição bioquímica e molecular, a frequência dos casos de manifestação tardia tem aumentado, mostrando grande heterogeneidade clínica.

Assim como na forma clássica, a forma tardia também não apresenta distribuição precisa. Contudo, parece ser mais comum no sudeste da Itália e na Sicília. Estima-se que as formas tardias representem 10 a 15% de todos os casos da doença de Krabbe (Lyon, *et al.*, 1996).

A grande variabilidade clínica observada na doença de Krabbe, em particular nas formas tardias, pode ser resultante de diferentes mutações, as quais, obviamente, determinariam diversos efeitos na atividade da enzima **GALC**.

Bioquímica

O galactosilceramídeo (galactocerebrosídeo) é um lipídio abundante no sistema nervoso central mas é, praticamente, ausente nos órgãos sistêmicos dos mamíferos, exceto nos rins, onde pode ser encontrado em pequena quantidade (Makita *et al.*, 1964). A maior concentração de galactosilceramídeo está no cérebro, particularmente na substância branca, na mielina, sendo sintetizado nos oligodendrócitos e nas células de Schwann.

Esse esfingolipídio é constituído por uma cadeia básica longa, denominada esfingosina, e uma galactose. A esfingosina, por sua vez, está acetilada no seu grupo amino por um ácido graxo de cadeia longa, passando a se chamar, então, ceramídeo (figura 1).

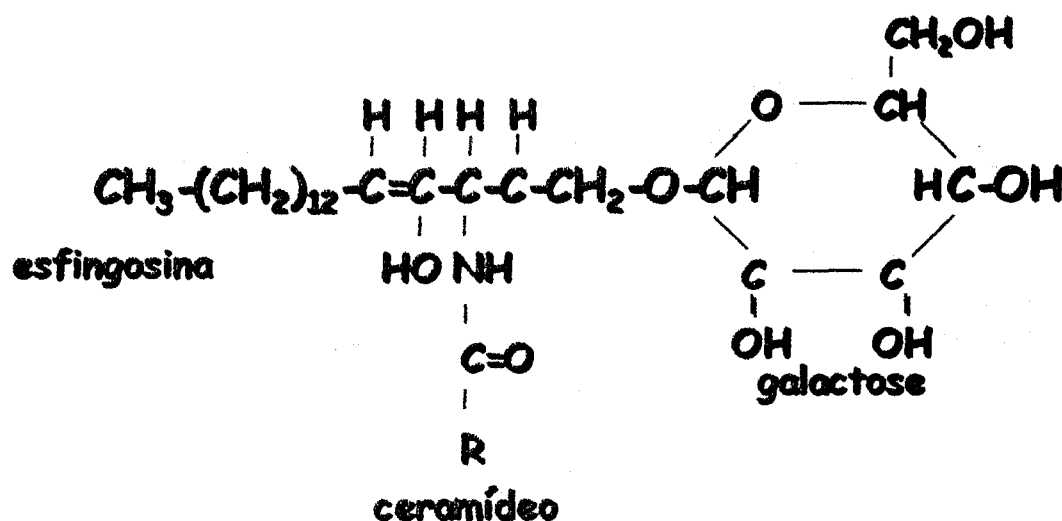


Figura 1 - Estrutura do galactosilceramídeo.

A síntese e o metabolismo do galactosilceramídeo e compostos relacionados são muito importantes no estudo das leucodistrofias (Morell *et al.*, 1969). A degradação por hidrólise, do galactosilceramídeo em ceramídeo e galactose, é feita pela enzima lisossômica galactosilcerebrosidase (galactosilceramídeo- β -galactosidase - **GALC**) (Suzuki *et al.*, 1971).

A deficiência da **GALC** consiste no defeito primário da doença de Krabbe (Suzuki & Suzuki, 1970). É observada em todos os pacientes com a doença e as alterações morfológicas são somente encontradas no sistema nervoso, onde níveis significantes de galactosilceramídeo estão presentes. Estudos experimentais, por sua vez, mostram que essa substância é a única capaz de estimular a infiltração de macrófagos no cérebro, os quais se transformam nas células globóides multinucleadas, características da doença (Olsson *et al.*, 1966).

A mielina do cérebro de mamíferos adultos contem geralmente, 15 a 18% de galactosilceramídeo em peso seco (O'Brien *et al.*, 1967). Pelo fato de o galactosilceramídeo ser sintetizado nos oligodendrócitos e nas células de Schwann ele é, praticamente, ausente no cérebro antes da mielinização. Conceitualmente, a doença de Krabbe é uma "doença de depósito" e portanto, seria natural esperar um acúmulo do substrato natural da **GALC**. Entretanto, o galactosilceramídeo não é acumulado em níveis anormais no sistema nervoso central em todas as espécies já estudadas.

Alguns aspectos químicos e metabólicos do galactosilceramídeo são críticos na fisiopatogênese da doença de Krabbe. Pelo menos *in vitro*, a enzima **GALC** parece atuar em outros três substratos, a psicossina, o lactosilceramídeo e o monogalactose dihidroglicerídeo (Myatake & Suzuki, 1972; Wenger *et al.*, 1973; Tanaka *et al.*, 1977). Na tentativa de explicar, a presença das células globóides e a curiosa falta de acúmulo de galactosilceramídeo, Myatake e Suzuki, em 1973, sugeriram a hipótese da psicossina.

Como foi dito, o galactosilceramídeo é normalmente degradado em ceramídeo e galactose pela **GALC** e, em seguida, em esfingosina e ácido graxo pela ceramidase. Existe, contudo, um caminho de degradação alternativo que envolve a desacilação do galactosilceramídeo em psicossina (galactosilesfingosina) e ácido graxo, seguida pela clivagem da galactose, para a produção de esfingosina (figura 2) (Cleland & Kennedy, 1960).

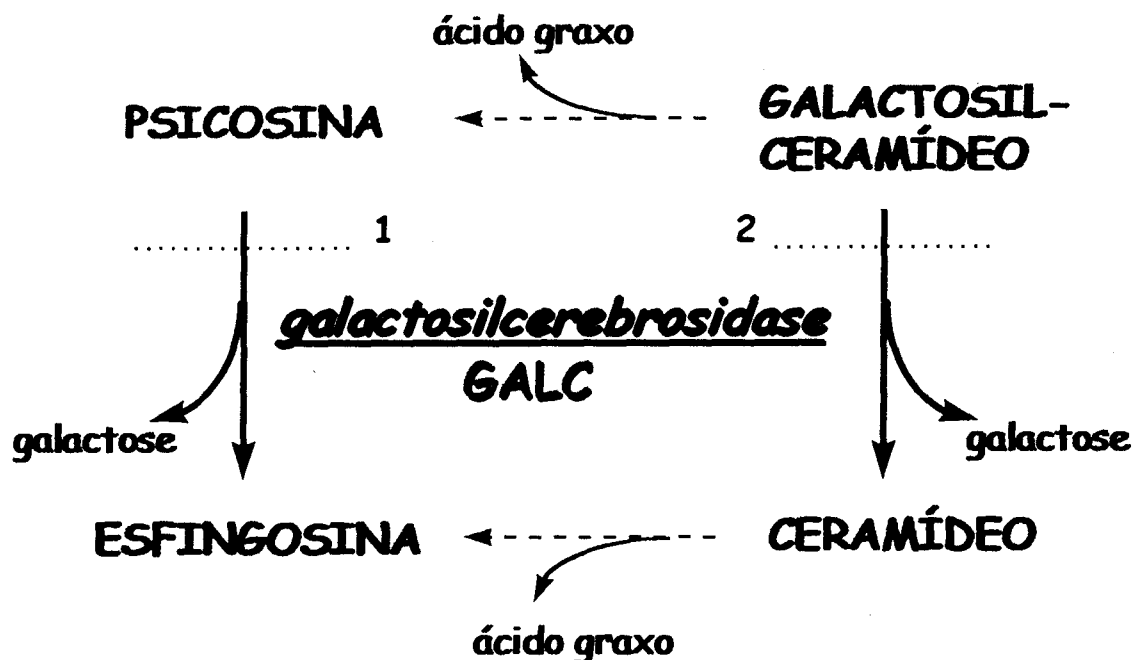


Figura 2 - Metabolismo do galactosilceramídeo e caminho degradativo alternativo proposto (Myatake & Suzuki, 1972).

Sabe-se que a psicossina, contendo um grupo amino livre, é um metabólito altamente citotóxico. Com o hipotético caminho alternativo de degradação, bloqueando os passos 1 e 2 (figura 2) que envolvem a degradação do galactosilceramídeo e da psicossina pela GALC, haveria um conseqüente acúmulo de psicossina.

Essa psicossina, gerada dentro dos oligodendrócitos durante a mielinização, atingindo níveis tóxicos causaria a destruição celular. E de fato, um aumento de até 100 vezes no nível de psicossina foi observado na substância branca de pacientes com a doença de Krabbe (Vanier *et al.*, 1975, 1976; Igsu *et al.*, 1984).

Resumindo, antes da mielinização não há, praticamente, galactosilceramídeo no cérebro e, portanto, a deficiência da GALC é de menor importância. Uma vez iniciada a mielinização, também começa a formação de galactosilceramídeo, que não pode ser catabolizado, estimulando a infiltração de macrófagos, com a formação das células globóides. Pela deficiência da GALC, vai ocorrer um acúmulo do outro substrato, a psicossina, que destrói a substância branca, interrompendo o processo de mielinização e, conseqüentemente a produção e o acúmulo do galactosilceramídeo.

Histopatologia

Na doença de Krabbe, as lesões histopatológicas se limitam ao sistema nervoso e são similares em todas as espécies já estudadas. O comprometimento principal ocorre no processo de mielinização.

A observação de necrópsias e exames neurohistopatológicos mostrou que a leucodistrofia por células globóides é uma doença com progressiva desmielinização. Foi sugerida, devido a essas observações, a seguinte seqüência de eventos nas lesões histopatológicas: 1 - o aparecimento das células globóides no último estágio da desmielinização; 2 - a degeneração da substância branca com o aumento das células globóides; 3 - o desaparecimento das células globóides, no estágio terminal, quando há marcante gliose (D'Agostino *et al.*, 1963).

O diagnóstico anátomo-patológico da doença de Krabbe é feito por biópsia cerebral, quando são identificadas, na substância branca, as células globóides características, associadas à perda de mielina e a gliose astrocística. As células globóides, multinucleadas, redondas ou ovais, com o citoplasma geralmente granuloso, tendem a se agrupar em torno dos vasos sanguíneos. Entretanto, pelo menos dois casos já foram descritos com deficiência da **GALC** e ausência das células globóides, por mecanismos não esclarecidos (Dunn *et al.*, 1976; McKelvie *et al.*, 1991).

Ao exame macroscópico do sistema nervoso central, nota-se significativa redução da substância branca, claramente desmielinizada. Em contraste com a perda da substância branca, a cinzenta quase não é afetada, embora tenham sido observados alguns casos com degeneração do córtex cerebral, tálamo e núcleo cerebelar (Blackwood *et al.*, 1954).

Os nervos periféricos são afetados com uma esclerose colágena intersticial e alterações nas bainhas de mielina e nos axônios. Há desmielinização e infiltração perivascular de macrófagos, resultado do acúmulo de substância lipídica no interior das células de Schwann (Gutmann *et al.*, 1969).

Genética molecular

O gene que codifica a enzima **GALC** foi clonado em 1993 (Chen *et al.*, 1993; Sakai *et al.*, 1994). Os seus 17 exons somam 3780 bp e estão distribuídos numa extensão de 60 kb, na região q31 do cromossomo 14 (Oehlmann *et al.*, 1993).

O cDNA do gene que codifica a enzima **GALC** foi clonado por dois grupos concomitantemente (Chen, *et al.*, 1993; Sakai, *et al.*, 1994). O primeiro passo para a clonagem do gene foi a purificação da **GALC**, a partir de urina humana (Chen & Wenger, 1993).

Após a purificação da proteína **GALC**, a eletroforese em gel SDS-PAGE (*sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) mostrou uma banda com cerca de 80 kDa, três bandas entre 50-53 kDa e uma outra banda de 30 kDa. A dissociação da proteína em subunidades indica que a maior atividade da enzima está entre os pesos moleculares 45-66 kDa.

Uma sequência comum das regiões N-terminal de porções purificadas da proteína, correspondentes às três bandas entre 50-53 kDa e a banda de 80 kDa, foi utilizada na localização do gene. Chen e colaboradores (1993) usaram *primers* degenerados derivados da região N-terminal da banda de 51 kDa na amplificação do mRNA, a partir de testículos de gato. O produto dessa amplificação, obtida pela técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR), foi utilizado para rastrear uma biblioteca de cDNA de testículo e cérebro humanos. A estratégia do outro grupo que também clonou o gene se baseou no rastreamento de uma biblioteca de cDNA de placenta humana (Sakai *et al.*, 1994).

A sequência de cDNA isolada de 3780 bp, tem uma cadeia aberta de leitura de 2007 bp que codificam 669 aminoácidos. O mRNA total possui, na região 5', 47 bp antes do codon de iniciação e, na 3' terminal, 1741 bp, a partir do codon de terminação, incluindo a região de poliadenilação. A sequência completa do gene é apresentada na figura 3 (Chen *et al.*, 1993; Sakai *et al.*, 1994).

O tamanho de cada exon e intron pode ser observado na tabela 2. Os tamanhos exatos do primeiro e último exons não são conhecidos. Além disso, pode ser observado um transcrito menor, de 1217 bp, desse gene, o qual utiliza um sítio alternativo de poliadenilação, que está a 195 nucleotídeos a partir do intron 10 (Chen *et al.*, 1993; Sakai *et al.*, 1994). A sequência desse transcrito de menor tamanho é mostrada na figura 4.

[illegible]

Figura 3 - Sequência do cDNA do gene da GALC (Chen *et al.*, 1993)
Genome Sequence Data número de acesso **L23116.**

Tabela 2 - Sequências das junções exons/introns do gene da GALC.

Exon	Exon tamanho (bp)	Posição do intron	Sequência das junções exon-intron região 5'..... região 3'	Intron tamanho (kb)
1	>500	147	GGCGGCGGGgtgagcggca...tttttttagGCAACCTCC	4,3
2	69	216	CTCTTTAAGgtaaatgaaaa...cttttcacagCCGAATTTT	0,247
3	64	280	AGACAACAGgtaggagaat...ctctattcagACGGCACTG	1,5
4	114	394	CACTCATTTGgtaagaaatg...ctctctgcagGGTTGCCAT	1,8
5	140	534	TATATTGGAgtagtaata...tgttttgcagATTTGGAAT	2,1
6	39	573	TATATTAAGgtgtgtacaa...actccaaaagATATTAAGA	5,4
7	131	704	TGTTATAGGgtaaggcatg...ttttttctagGGCTCATTA	7,4
8	156	860	TATGACTTCgtaagttatt...aatcttttagCACAATCGC	2,6
9	125	985	GGGTATCAGgtatggttca...ttttctatagCTCATACCA	1,9
10	128	1113	GAAACCATGgtaaaactttt...tttttttcagAGTCATAAA	12,0
11	90	1203	GGATCTTTTgtaagtaaat...ttctttcacgAGTGAAATA	0,7
12	87	1290	TCTCTATGGgtaatttttaa...tctttttcagCTCCTTGAC	1,9
13	151	1441	TCAATGTTGgtgagtattt...ttctgaacagATTACCCAT	2,0
14	181	1622	CTACAACTGgtaagattga...tattttgcagGACCAATCT	3,9
15	164	1786	GTGATTTAGgtaagtact...tgtgttacagCTGGATGGA	1,4
16	77	1863	ACTATTAAGgtaagtattg...tctactctagGGTCATTTT	4,8
17	1870	-		

(Luzi *et al.*, 1995b)

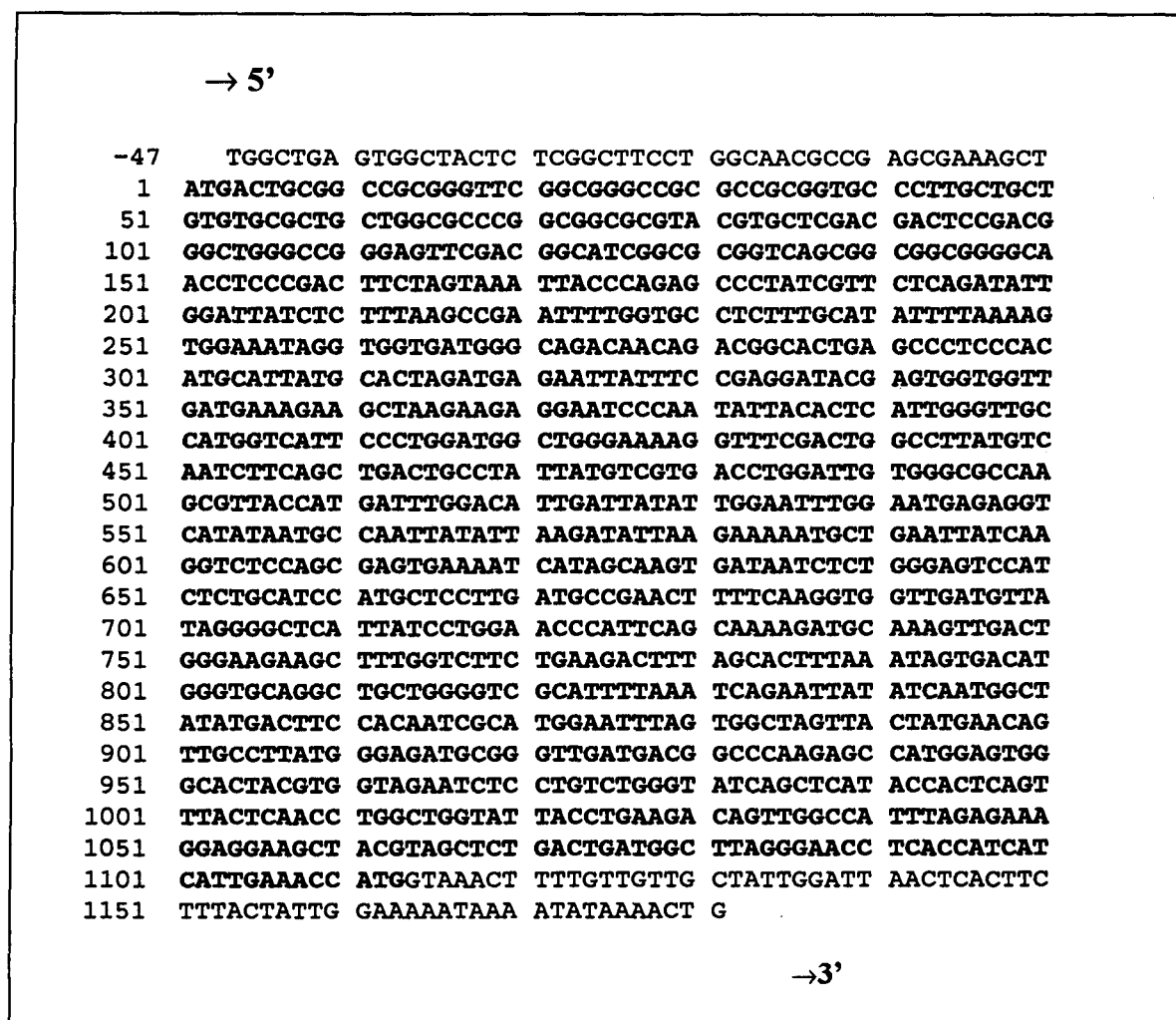


Figura 4 - Sequência do cDNA que resulta do sítio alternativo de poliadenilação após o exon 10. Em negrito, exons 1→ 10 (Sakai *et al.*, 1994) *Genome Sequence Data Base* número de acesso D25284.

Na mesma ocasião da clonagem do gene, uma mutação sem sentido foi determinada em um paciente com sinais típicos da doença de Krabbe, na posição 369 (GAA→TAA), resultando em um codon de terminação, assim como duas regiões polimórficas, nas posições 865 (ATC→GTC) e 1637 (ATA→ACA) (Sakai *et al.*, 1994).

O polimorfismo na posição 502, com a substituição da base C por T, resultando na troca aminoácida na posição 168 de uma arginina por cisteína, foi relatado, no início, como uma mutação responsável pela doença de Krabbe mas, posteriormente, foi verificado tratar-se de uma região polimórfica.

A principal constatação de que a região 502 era polimórfica, veio com a observação feita por Wenger e colaboradores (1993), de uma longa deleção a partir do exon 10. Essa deleção foi localizada em, aproximadamente, 5 kb das 12 kb do intron 10, pela impossibilidade de se amplificar seqüências após o exon 10. No mesmo trabalho, o polimorfismo C⁵⁰²→T, o principal dos alelos mutantes observados em pacientes com doença de Krabbe, foi associado à deleção. Em todos os pacientes que possuíam a deleção, o polimorfismo C⁵⁰²→T está presente, no mesmo alelo.

Estudos de expressão, utilizando a seqüência com o polimorfismo e a deleção (C⁵⁰²→T/del), mostraram uma diminuição de 15-18 vezes da atividade normal da proteína, estimando uma perda de 15% da região correspondente à subunidade de 50 kDa e a toda a região de 30 kDa. Entretanto, o vetor contendo somente o polimorfismo C⁵⁰²→T, mas sem a deleção, resulta em uma atividade normal da proteína, indicando que esse não pode, isoladamente, ser responsável pela doença. Além disso, o polimorfismo é observado em uma freqüência de 5/112 indivíduos normais (Rafi *et al.*, 1995).

Seguindo ainda os estudos com o polimorfismo 502 associado a deleção (C⁵⁰²→T/del), Luzi e colaboradores (1995a), desenvolveram um método rápido para detecção da deleção em DNA genômico, pela identificação exata do ponto de quebra, utilizando três diferentes *primers*, com um na região deletada. Essa região inclui 30 kb iniciando-se no meio do intron 10 do gene **GALC**, se estendendo aos exons 11 a 17, que representam 20 kb. Os indivíduos homozigotos para a deleção mostram a amplificação de um fragmento de 329 bp, enquanto que os heterozigotos apresentam uma banda extra de 615 bp. Não foi encontrado nenhum paciente com a deleção que não contivesse a base T na posição 502. A análise das seqüências próximas às junções da deleção, revelaram uma seqüência repetida de 4 bp que pertence à família de seqüências *Alu*. É provável que um pareamento desigual tenha sido a causa da deleção.

A clonagem do gene permitiu iniciar estudos das alterações na sequência, e fazer associações das mutações encontradas com a atividade da **GALC**. Da mesma forma, foi possível dar início aos estudos de correlação fenótipo/genótipo, considerando a grande heterogeneidade clínica da doença.

A tabela 3 e a figura 5 mostram as alterações encontradas até o momento, no gene da **GALC**, incluindo mutações, inserções, deleções e polimorfismos.

Tabela 3 - Alterações já descritas no gene da **GALC**.

	Nucleotídio	Aminoácido	Exon	Referência
1	G ¹³ →C	Arg → Pro	1	Luzi <i>et al.</i> , 1996
2	C ²⁷ →A	Arg → Glu	1	Luzi <i>et al.</i> , 1996
3	G ¹⁸⁸ →A	Arg → His	2	De Gasperi <i>et al.</i> , 1996
4	A ²⁸⁶ →G	Thr → Ala	4	Luzi <i>et al.</i> , 1996
5	G ³⁶⁹ →T	Glu→ stop	4	Sakai <i>et al.</i> , 1994
6 ^a	del	stop	11-17	Rafi <i>et al.</i> , 1995
7 ^a	C ⁵⁰² →T	Arg→Cys	5	Rafi <i>et al.</i> , 1995
8	A ⁵¹² →T	Asp → Val	5	Luzi <i>et al.</i> , 1996
9 ^b	del12/ins3 635	frameshift	7	Tatsumi <i>et al.</i> , 1995
10	G ⁶⁹⁴ →A	Asp → Asn	7	Luzi <i>et al.</i> , 1996
11	T ⁷⁰¹ →C	Ile → Thr	7	De Gasperi <i>et al.</i> , 1996
12	G ⁷³⁹ →A	Ala → Thr	8	Rafi <i>et al.</i> , 1995
13	G ⁸⁰² →A	Gly → Ser	8	De Gasperi <i>et al.</i> , 1996
14 ^a	A ⁸⁶⁵ →G	Ile →Val	9	Sakai <i>et al.</i> , 1994
15	C ⁹⁰⁴ →G	Pro → Ala	9	Tatsumi <i>et al.</i> , 1995
16	G ¹¹⁰⁵ →T	Glu→ stop	10	Sakai <i>et al.</i> , 1994
17	C ¹¹³⁸ →T	Arg → Trp	11	Rafi <i>et al.</i> , 1995
18	C ¹⁵⁴³ →T	Arg → Cys	14	Rafi <i>et al.</i> , 1995
19	G ¹⁵⁸² →A	Asp → Asn	14	Rafi <i>et al.</i> , 1996
20 ^a	G ¹⁶³⁷ →A	Ile→Thr	15	Sakai <i>et al.</i> , 1994
21	T ¹⁶⁴⁹ →G	Val→Gly	15	Tatsumi <i>et al.</i> , 1995
22 ^b	ins T 1675	frameshift	15	Rafi <i>et al.</i> , 1995
23	T ¹⁷⁴⁸ →G	Ile → Ser	15	Rafi <i>et al.</i> , 1996

(a) - região polimórfica; (b) mudança no quadro de leitura.

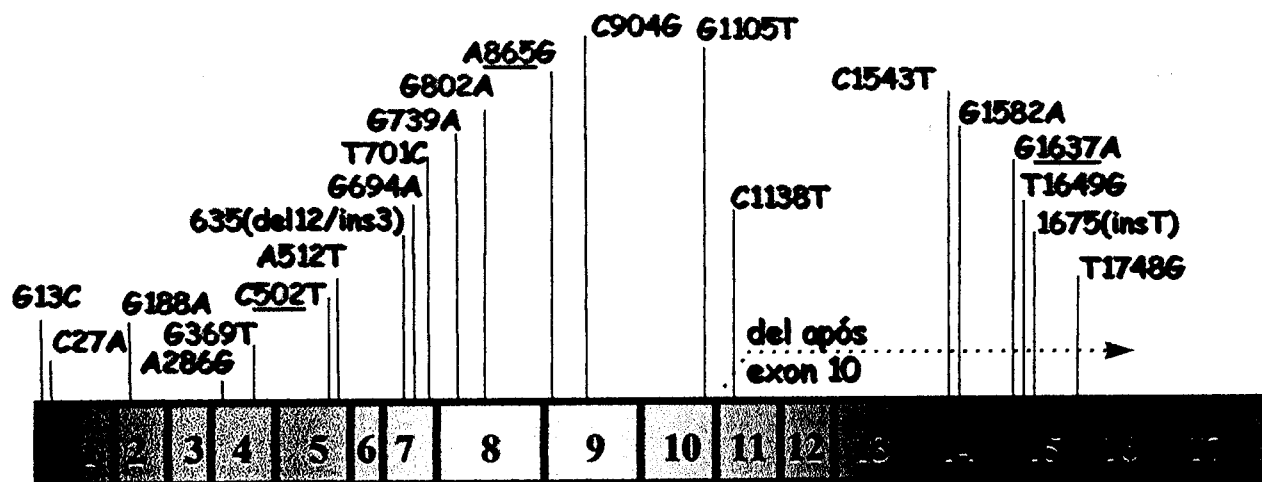


Figura 5 - Mapa das alterações encontradas no gene da GALC.

Diagnóstico e tratamento

O diagnóstico clínico da doença de Krabbe é dificultado pelo considerável número de doenças neurodegenerativas que apresentam quadros clínicos similares e sua confirmação é feita, principalmente, pela medida da atividade da **GALC**. As dosagens enzimáticas são, muitas vezes, complicadas pela atividade reduzida da enzima em indivíduos normais, os chamados pseudodeficientes. Dessa forma, o diagnóstico dos heterozigotos pode ser dificultado, pela sobreposição dos valores encontrados na população normal (Wenger & Riccardi, 1976).

A combinação do diagnóstico enzimático e histológico é, em geral, suficiente, mas o recurso da análise molecular é importante nos casos de identificação dos heterozigotos, permitindo um diagnóstico mais preciso, ou inclusive no período pré-natal.

Apesar da grande variedade de mutações, inserções e deleções encontradas até agora no gene, a análise molecular é lenta e, muitas vezes inconclusiva. Contudo, a possibilidade desse tipo de análise permite que mais casos tardios e (ou) atípicos sejam diagnosticados, fornecendo novos dados com relação às frequências na população, assim como o mapeamento das mutações mais comuns. A associação das diferentes mutações com o quadro clínico está apenas começando.

O diagnóstico pré-natal para casais de risco é realizado por dosagens enzimáticas, desde 1971, a partir de amostras de vilosidade coriônica ou cultura de células de líquido amniótico (Suzuki *et al.*, 1971). A identificação das mutações em famílias afetadas facilita esse diagnóstico, pois o resultado final pode ser baseado na combinação de ambas as análises, enzimática e molecular.

Em relação ao tratamento, não existe nenhum esquema terapêutico específico para a doença, mas alguns recursos têm sido testados, tais como, a reposição enzimática utilizando lipossomos (Umezawa *et al.*, 1985); o transplante de medula óssea (Krivit *et al.*, 1990; Shapiro *et al.*, 1995) e a terapia gênica (Gama Sosa *et al.*, 1996). As tentativas no sentido de se realizar a infusão da enzima deficitária não foram bem sucedidas, em especial por não ter sido possível ultrapassar a barreira hematoliquórica.

O transplante de medula óssea (TMO) tem sido proposto para o tratamento de doenças de depósito, pois células sangüíneas e macrófagos derivados da medula podem servir de fonte contínua da enzima deficiente (Hobbs *et al.*, 1981). Há aumento dos níveis enzimáticos em vários tecidos após o transplante (Krivit *et al.*, 1984) mas, em seres humanos, não é conhecida a atividade enzimática pós-transplante, no sistema nervoso central.

O transplante de medula óssea em camundongos *twitcher* resultou em um aumento da atividade da **GALC** em todos os órgãos estudados e aumentou em três vezes a sobrevivência desses animais (Hoogerbrugge *et al.*, 1988). A dosagem enzimática da **GALC**, em pacientes submetidos ao transplante tem sido realizada, como indicativo no sucesso do mesmo. O seguimento de mutações, previamente determinadas por análise molecular, após o TMO, poderia avaliar melhor a eficácia desse procedimento. Nos pacientes com a forma clínica tardia da doença de Krabbe, o TMO parece ser efetivo, embora os resultados ainda não sejam conclusivos. O obstáculo está no tratamento dos casos clássicos, devido ao curso rápido da doença e havendo inclusive relato de danos neurológicos já ao nascimento em alguns pacientes (Ida *et al.*, 1994). Nesses casos, o transplante não determina qualquer melhora (Shapiro *et al.*, 1995).

A terapia gênica em doenças neurológicas é um desafio ampliado pela inacessibilidade das células do sistema nervoso. Estudos com modelos animais, entretanto, tiveram alguns resultados positivos, especificamente em relação à doença de Krabbe, pesquisas recentes utilizando transferência de cDNA do gene que codifica a **GALC**, mediado pelo retrovírus **SL3-3**, em fibroblastos transformados de camundongo *twitcher* e fibroblastos humanos de pacientes com a forma tardia da doença de Krabbe, mostraram a capacidade de correção do fenótipo das células deficientes *in vitro* (Gama Sosa *et al.*, 1996).

O estabelecimento de um prognóstico correto e as futuras terapias virão rapidamente, influenciado, sem dúvida, pelos avanços da biologia molecular. A determinação de novas mutações poderá trazer informações como, por exemplo, em quais regiões do gene elas seriam mais ou menos danosas para a atividade da proteína, cujo mecanismo ainda não se encontra completamente elucidado; ou quais seriam as mutações mais comuns, e se há algum grupo étnico preferencial; a determinação de *hot spots*; ou ainda a associação da mutação à clínica e à expressão da proteína.

Pelo padrão de herança autossômico recessivo na doença de Krabbe, os indivíduos podem ser ou homozigotos para uma determinada mutação, ou heterozigotos, aqueles que possuem uma mutação em um alelo e outro alelo normal, ou ainda heterozigotos compostos, aqueles com diferentes mutações em cada um dos alelos. A determinação prévia de mutações proporciona um diagnóstico preciso de cada um dos casos, principalmente quando existem indivíduos com pseudodeficiência da enzima. Esses indivíduos podem ter um alelo com uma mutação deletéria e o outro alelo normal, contendo um polimorfismo que eventualmente acarretaria em uma baixa atividade enzimática. A diferenciação nessa situação pode evitar, portanto, que indivíduos heterozigotos, possam ser erroneamente diagnosticados como afetados.

A caracterização de novos polimorfismos moleculares, por sua vez, é importante não só para o estudo da biologia molecular do gene, como também para identificar marcadores genéticos, que possam ser utilizados para diagnóstico.

Desde a descoberta do defeito primário associado à doença de Krabbe já se passaram 20 anos. O recurso da análise molecular se configura como uma ferramenta importante para a melhor compreensão dessa condição e de suas perspectivas terapêuticas, além de ser útil na avaliação dos efeitos do TMO sobre o curso clínico. Levando em conta todos esses aspectos, e visando contribuir para uma melhor compreensão das bases moleculares da doença de Krabbe, foi desenvolvido este trabalho.

Objetivos

- 1 - Identificar novas mutações e polimorfismos no gene responsável pela doença de Krabbe.
- 2 - Verificar a possibilidade de utilização da análise molecular como método prático na diferenciação genotípica, principalmente nos casos de indivíduos com pseudodeficiência da enzima galactosilcerebrosidase.
- 3- Verificar a possibilidade de utilização da análise molecular na avaliação do sucesso do transplante de medula óssea em pacientes com a doença de Krabbe.

Material e métodos

I - Casuística

Foram estudados, no total, 46 indivíduos, oriundos de 8 famílias diferentes, 13 deles selecionados pela demonstração da deficiência na atividade da **GALC**, em leucócitos e (ou) fibroblastos, segundo a técnica descrita por Wenger e Willians (1991). Dentre esses, 3 eram assintomáticos e os demais apresentavam manifestações clínicas descritas na doença de Krabbe. Apenas 1 possuía a forma clássica infantil da doença, nos outros o quadro correspondia ao das formas tardias. O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Neurogenética da New York University (NYU) - Medical Center, Nova York. O material de estudo foi gentilmente cedido pelo Dr. Edwin H. Kolodny, chefe do Departamento de Neurologia da NYU.

Três dos casos correspondentes às famílias 1, 5 e 6 foram previamente descritos em seus aspectos clínicos (Kolodny *et al.*, 1991; Grewal *et al.*, 1991). Os indivíduos 9 (família 2) e 45 (família 8) foram submetidos à transplante de medula óssea (TMO).

Tabela 4 - Famílias e pacientes estudados.

FAMÍLIA (origem étnica)	PACIENTE (sexo)	IDADE DE INÍCIO	IDADE ATUAL	SINAIS E SINTOMAS
1 (Indiano)	2 (F) Kolodny <i>et al.</i> , 1991 (caso 7)	6 anos	25 anos	quadriparesia espástica, convulsões, neuropatia periférica, atrofia grave da substância branca
	3 (M) Kolodny <i>et al.</i> , 1991 (caso 8)	4 anos	falecido (16 anos)	quadriparesia espástica, leve neuropatia, atrofia moderada da substância branca
2 (Irlandês, Alemão Italiano)	8 (F)	4 anos	14 anos	regressão motora, dificuldade de marcha
	9 (M)	-	11 anos (TMO)	assintomático, tratado com TMO
	10 (M)	4 anos	10 anos	dificuldade de marcha e de aprendizado
3 (Irlandês, Inglês, Nativo Norte Americano)	13 (F)	13 anos	25 anos	quadriparesia espástica progressiva
4 (Irlandês, Inglês, Francês, Nativo Norte Americano)	20 (F)	5 meses	falecido (3 anos)	importante irritabilidade e rigidez
5 (Polonês)	25 (M) Kolodny <i>et al.</i> , 1991 (caso 14) Grewal <i>et al.</i> , 1991	13 anos	35 anos	quadriparesia espástica progressiva
6 (Italiano)	26 (F) Kolodny <i>et al.</i> , 1991 (caso 15)	infância	falecido (73 anos)	hemiparesia esquerda, neuropatia
7 (Afro- Norte- Americano)	42 (M)	16 anos	17 anos	quadriparesia progressiva
	43 (F)	-	16 anos	assintomático
8 (Inglês, Alemão, Norueguês)	45 (M)	-	4 anos (TMO)	assintomático, tratado com TMO
	46 (M)	1 ano	falecido (27 meses)	regressão motora

(TMO) - transplante de medula óssea.

II - Métodos

A - Estratégia utilizada

Para a localização das mutações, inicialmente foi feito um rastreamento do cDNA, obtido a partir de mRNA extraído de leucócitos e (ou) fibroblastos, pela técnica de SSCP (*single-strand conformation polymorphisms*) (Orita *et al.*, 1989). Para facilitar a análise, o gene da GALC, cuja região codificante é de, aproximadamente, 2 kb, foi dividido em 6 fragmentos, os quais foram amplificados pela técnica de PCR (Erlich *et al.*, 1988), como mostra a figura 6.

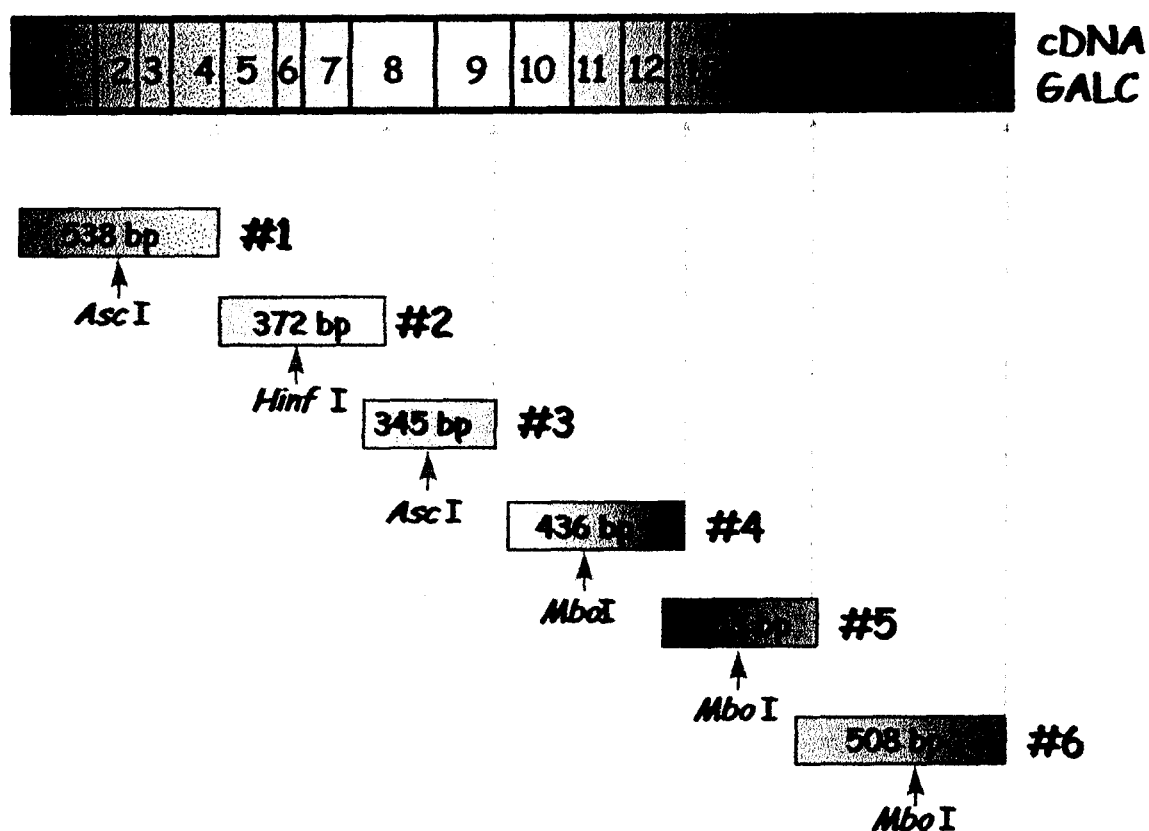


Figura 6 - Divisão da região codificante do gene da GALC em 6 diferentes fragmentos e localização do corte em subfragmentos.

Para o rastreamento das mutações pela técnica de SSCP, cada um dos fragmentos foi subdividido em outros dois subfragmentos, com a finalidade de tornar o resultado mais informativo. Diante de qualquer indício de mutação em algum dos fragmentos, esse era, então, clonado e sequenciado (Sanger *et al.*, 1977). Pelo menos 8 clones diferentes de cada fragmento foram sequenciados. Encontrada a mutação, seguia-se a análise da situação alélica da mesma, em DNA genômico. Isso foi feito pela técnica de ASOH (*allele-specific oligonucleotide hybridization*) (Maniatis *et al.*, 1990), por análise de restrição, ou mesmo por sequenciamento, dependendo de cada situação em particular.

Tratando-se de um mesmo indivíduo, uma vez encontrada uma mutação em um alelo, o outro era obtido por meio de amplificação pela técnica de PCR longo e analisado. Esta técnica permite amplificar toda a região codificante de uma só vez. O produto do PCR de toda a região codificante foi clonado sendo descartados os clones que continham a primeira mutação. Além disso, o outro alelo era sequenciado completamente, na busca de outra mutação. Encontrada uma segunda mutação, seguia-se a mesma metodologia, ou seja, a confirmação da mutação em DNA genômico, pelas técnicas já mencionadas.

Neste trabalho, a opção foi por utilizar uma estratégia simples, porém não fixa, sendo seguidas diferentes seqüências de experimentos, escolhidas na dependência de cada caso.

A possibilidade de alguma mutação ser um polimorfismo foi afastada, ou confirmada, pelo estudo da mutação em indivíduos não portadores da doença de Krabbe. O sequenciamento completo de ambos os alelos foi realizado somente nos indivíduos com deficiência na atividade da GALC.

A figura 7 resume a estratégia utilizada.

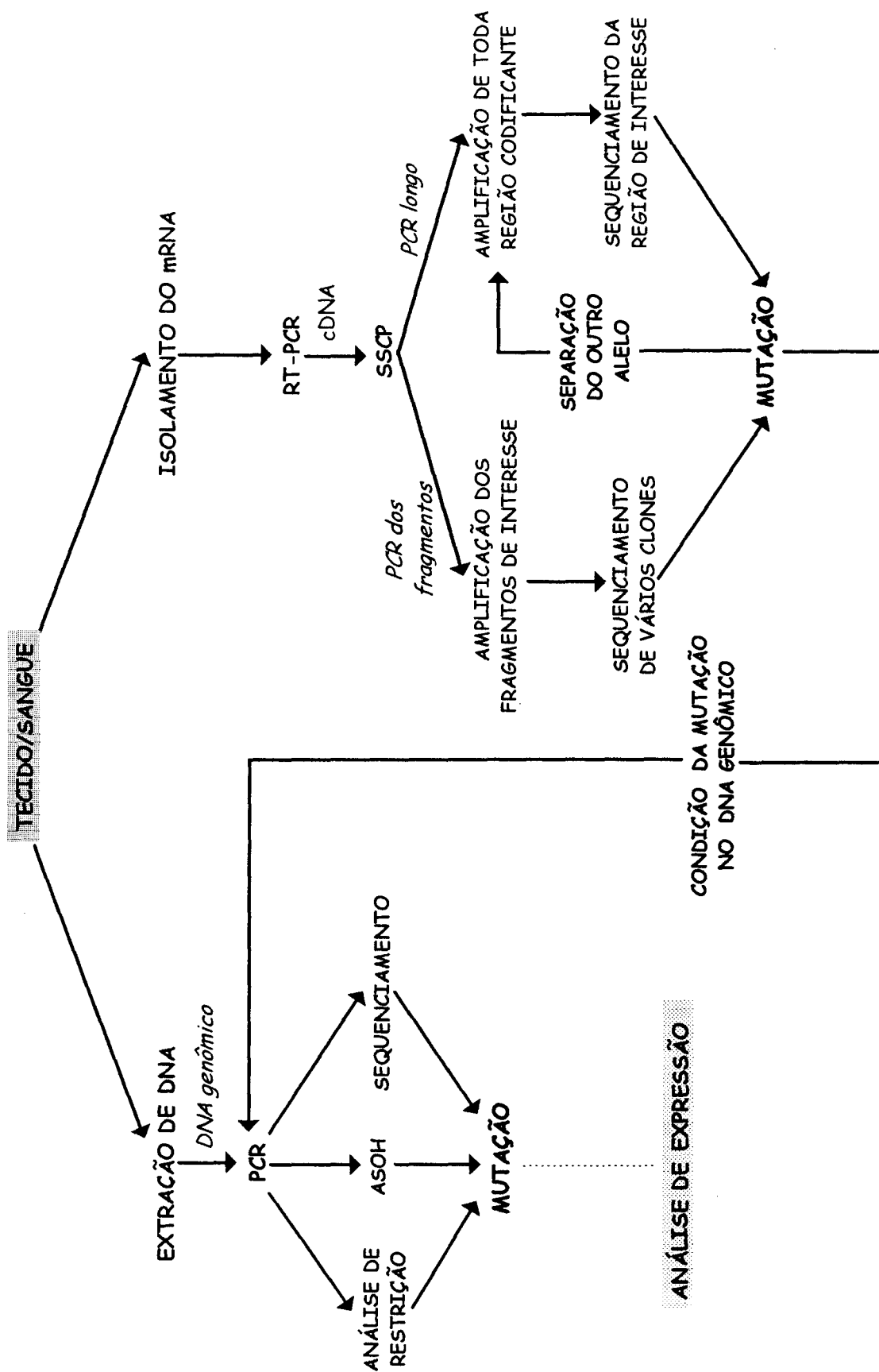


Figura 7 - Estratégia utilizada como método.

B - Descrição dos métodos

1 -Extração de DNA de sangue periférico (Maniatis et al., 1990 - modificado):

A 5ml de sangue total, coletados em tubos à vácuo (*Vacutainer*), adicionou-se 5ml de tampão A (sacarose 0,32M; Tris-HCl pH 7,5 10mM; MgCl₂ 5mM; triton X-100 1%).

Após agitar, centrifugou-se a 3000 rpm por 10 minutos à temperatura ambiente. O sedimento foi ressuspensão em 1ml de tampão de lise (EDTA 24mM; NaCl 75mM; Tris-HCl pH7,5 10mM) contendo 0,5% de SDS e 150µg/ml de proteinase K.

Incubou-se a 65°C, durante à noite e, então, procedeu-se a extração, com 1ml de fenol saturado com Tris-HCl 2M pH8,0.

À fase aquosa superior, adicionou-se 0,5ml de clorofórmio/álcool isoamílico 24:1 e 0,1ml de acetato de sódio 3M.

Precipitou-se com 0,6 volumes de isopropanol. O sedimento foi seco e ressuspensionado em 300µl de TE (Tris-HCl 10 mM pH 7,5; EDTA 1mM).

2 - Isolamento de mRNA:

O isolamento de polyA+mRNA a partir de linfoblastos, leucócitos ou fibroblastos foi realizado utilizando-se o *kit Micro-FastTrack* (Invitrogen Corporation).

Nesse método as células são lisadas em um tampão contendo detergente e substâncias que degradam proteína e Rnase. O lisado é misturado a uma resina de celulose contendo oligo(dT). O DNA, as proteínas degradadas e os debris celulares são retirados pela lavagem com tampão de alta concentração salina. O RNA não poliadenilado é retirado com um tampão de baixa concentração salina e, finalmente, o mRNA é eluído da coluna por um tampão de eluição, isento de sal.

3 - Análise de mutações no cDNA.

a) Amplificações:

a.1) Amplificação do cDNA: RT-PCR (reverse transcriptase-PCR)

O cDNA foi obtido a partir do mRNA pela técnica de RT-PCR, a qual emprega a enzima transcriptase inversa, sendo usado o kit *GeneAmp RNA PCR* (Perkin Elmer). A amplificação foi feita empregando-se 2µl de mRNA nas seguintes condições de reação: 1X tampão PCR (KCl 500mM; Tris-HCl 100mM pH 8,3); dNTPs 1mM; 1U/µl *RNase Inhibitor*; 2,5U/µl *reverse transcriptase*; MgCl₂ 5mM; 2,5µM de *random primers*, em um volume final de reação de 20µl. O ciclo utilizado na amplificação é mostrado na figura 8.

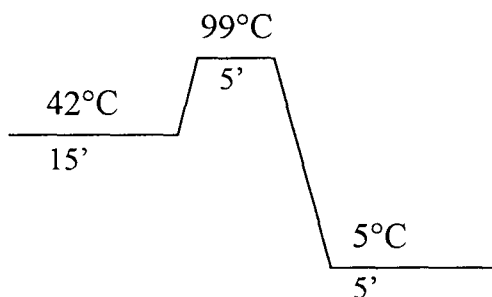


Figura 8 - Ciclo utilizado na obtenção do cDNA pela técnica de RT-PCR.

a.2) Amplificação dos fragmentos de cDNA: PCR

O cDNA obtido pela técnica de RT-PCR foi usado na amplificação dos fragmentos. Utilizou-se 3µl do cDNA e o kit *PCR Optimizer Kit* (Invitrogen Corporation). A reação se deu nas seguintes condições: 1X tampão de PCR (Tris-HCl 200mM pH 8,4; KCl 500mM); dNTPs 0,2mM; 0,1µg de cada *primer* (inverso e direto); 2,5U de *Taq* polimerase, em um volume final de 50µl. Os ciclos utilizados estão na figura 9.

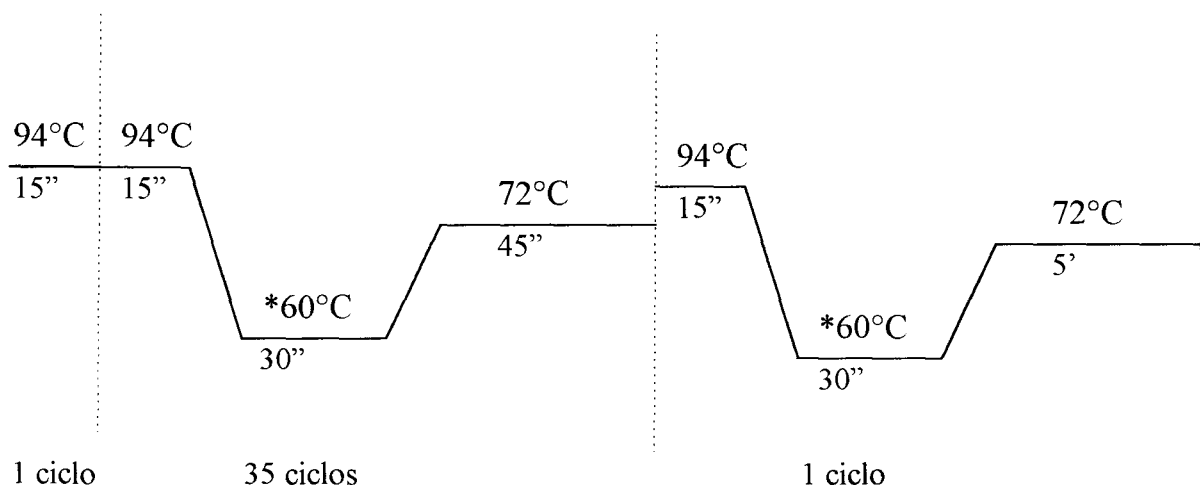


Figura 9 - Ciclos utilizados na amplificação dos fragmentos do gene da **GALC**, (* - temperatura 65°C para a amplificação do fragmento #1).

Os *primers* utilizados para cada região são especificados na tabela 5 e a localização desses *primers*, na sequência do gene, é mostrada na figura 10.

Tabela 5 - Sequências dos *primers* utilizados na amplificação do cDNA.

Fragmento	Posição (bp)	Sequência (5'→3')
1	-40	1F - GTG GCT ACT CTC GGC TTC CTG GCA
	498	1R - GGC GCC CAC AAT CCA GGT CAC
2	440	2F - GGC CTT ATG TCA ATC TTC AGC TGA
	812	2R - CAG CCT GCAC CCA TGT CAC TAT TT
3	705	3F - GGC TCA TTA TCC TGG AAC CCA TTC
	1050	3R - TTT CTC TAA ATG GCC AAC TGT CT
4	985	4F - GCT CAT ACC ACT CAG TTT ACT CAA
	1422	4R - ATA GGT ACT TGG GAA GGG CTG GGA
5	1318	5F - CTG AGC CTG CAT GAA GAT GAG CTG
	1671	5R - TGT GTC AGG GGT CTC TAT GTA AAC
6	1609	6F - GGA GAC TAC AAC TGG ACC AAT CTG
	2113	6R - CAA AAG CCT CAT ATA CTG TTC CAA T

tggetgagtggtactctcggcttcctggcaacgccgagcgaaagct...1.ATGACTGCGGCCGCGGGTTC
 GCGGGGCCGCGCCGCGGTGCCCTTGCTGCTGTGTGCGCTGCTGCGCGCCGCGCGCGGTACGTGCTCGACGA
 CTCCGACGGGCTGGGCGGGAGTTTCGACGGCATCGGCGCGGTGAGCGGCGGCGGGG...1G...2.CAACCTC
 CCGACTTCTAGTAAATTACCCAGAGCCCTATCGTTCTCAGATATTGGATTATCTCTTAAG.....3.CCG
 AATTTTGGTGCCTCTTTGCATATTTTAAAAGTGGAATAGGTGGTGGTGGGAGACAAACAG.....4.ACGG
 CACTGAGCCCTCCACATGCATTATGCACTAGATGAGAATTATTTCCGAGGATACGAGTGGTGGTTGATGAA
 AGAAGCTAAGAAGAGGAATCCCAATATTACACTCATTG.....5.GGTTGCCATGGTCATTCCCTGGATGGC
 TGGGAAAAGGTTTCGACTGGCCTTATGTCAATCTTCAGCTGACTGCCTATTATGTCGTGACCTGGATTGTGG
 GCGCCAAGCGTTACCATGATTGGACATTGATTATATTGGA.....6.ATTGGAATGAGAGGTCATATAA
 TGCCAATTATATTAAG...G5Fmut G7F 7.ATATTAAGAAAAATGCTGAATTATCAAGGTCTCCAGCGAGTGAAAAAT
 CATAGCAAGTGATAATCTCTGGGAGTCCATCTCTGCATCCATGCTCCTTGATGCCGAACTTTCAAGGTGGT
 TGATGTTATAGG...G7R 8.GGCTCATTATCCTGGAAACCCATTTCAGCAAAAGATGCAAAAGTTGACTGGGAAG
 AAGCTTTGGTCTTCTGAAGACTTTAGCACTTTAAATAGTGACATGGGTGCGAGGCTGCTGGGGTCGCATTTTA
 AATCAGAATTATATCAATGGCTATATGACTTC.....9.CACAATCGCATGGAATTTAGTGGCTAGTTACTA
 G8R TGAACAGTTGCCCTTATGGGAGATGCGGGTTGATGACGGCCCAAGAGCCATGGAGTGGGCACTACGTGGTAGA
 ATCTCCTGTCTGGGTATCAG.....10.CTCATACCACTCAGTTTACTCAACCTGGCTGGTATTACCTGAAG
 ACAGTTGGCCATTAGAGAAAAGGAGGAAGCTACGTAGCTCTGACTGATGGCTTAGGGAACCTCACCATCATC
 ATTGAAACCATG.....11.AGTCATAAACATTCTAAGTGACATACGGCCATTTCTTCCTTATTTCAATGTGT
 CACAACAATTTGCCACCTTTGTTCTTAAGGGATCTTTT.....12.AGTGAAATACCAGAGCTACAGGTATG
 GTATACCAAACCTTGGAACCAACATCCGAAAGATTTCTTTTAAAGCAGCTGGATTCTCTATGG.....13.CT
 CCTTGACAGTGATGGCAGTTTCACACTGAGCCTGCATGAAGATGAGCTGTTACACTCACCCTCTCACCAC
 TGGTGCAGAAAGGCAGCTACCCGCTTCTCCAAAATCCAGCCCTTCCCAAGTACCTATAAGGATGATTTCAA
 TGTTG...G14F 14.ATTACCCATTTTTTAGTGAAGCTCCAACTTTGCTGATCAAACTGGTGTATTGTAATA
 TTTTACAAATATTGAAGACCTGGCGAGCATCACTTCACGCTACGCCAAGTTCTCAACCAGAGACCCATTAC
 GTGGGCTGCCGATGCATCCAACACAATCAGTATTATAGGAGACTACAACCTG...G14R 15.GACCAATCTGAC
 TATAAAGTGTGATGTTACATAGAGACCCCTGACACAGGAGGTGTGTTTCATTGCAGGAAGAGTAAATAAAGGT
 GGTATTTTGAATTAGAAGTGCCAGAGGAATTTCTTCTGGATTTTGCAAATGGATCTT
 ACAGGGTTACAGGTGATTTAG.....16.CTGGATGGATTATATATGCTTTAGGACGTGTTGAAGTTACAG
 CAAAAAATGGTATACACTCAGTTAACTATTAAG.....17.GGTCATTTGCGCTCTGGCATGCTGAATGA
 CAAGTCTCTGTGGACAGACATCCCTGTGAATTTCCAAAGAATGGCTGGGCTGCAATTGGAACCTCACTCCTT
 TGAATTTGCACAGTTTGACAACCTTTCTTGTGGAAGCCACACGCTAATACTTAACAGGGCATCATAGAATACT
 CTGGATTTTCTTCCTTCTTTTGGTTTTGGTTTCAGAGCCAATTCTTGTTCATTGGAACAGTATATGAGGCT
 TTTGAGACTAAaataatgaagagtaaaaggggagagaaaattttatttttaattttaccctgtggaagatttta
 ttagaattaattccaaggg..... 6R

Figura 10 - Mapa das junções exons/introns do gene da GALC e localização dos primers utilizados.

a.3) Amplificação de toda a região codificante: PCR longo (extra long PCR)

A partir do cDNA, toda a região codificante do gene da **GALC**, com aproximadamente 2 kb, foi amplificada, sendo utilizado o kit *GeneAmp XL PCR* (Perkin Elmer).

Nessa técnica é empregada a enzima *rTth* polimerase, uma forma recombinante da DNA polimerase, obtida do *Thermus thermophilus*, usada na amplificação de grandes fragmentos de DNA. Além disso, o kit inclui um tampão especial, cuja composição exata não é fornecida pelo fabricante, que contém DMSO e glicerol, diminuindo a temperatura de desnaturação do DNA molde, e prevenindo a degradação e a depurinação do mesmo. Esse tampão contém também tricina, substância que aumenta a sua capacidade tamponante, durante o longo período de extensão e anelamento requeridos na reação. As condições de reação são as seguintes:

2µl cDNA

6µl tampão XL 3,3x (tricina; acetato de potássio; glicerol; DMSO)

2µl Mg(OAc)₂ 25mM (concentração final 1,1mM)

4µl dNTP 2mM (concentração final 200µM cada)

1µl *primer* 6R (0,1µg) → seqüências - tabela 5

1µl *primer* 1F (0,1µg)

em um volume final de 40µl.

A mistura foi então submetida a um pré-ciclo de:

80°C.....5 minutos

25°C.....2 minutos.

Adicionou-se em seguida mais 10µl de tampão 3,3x XL contendo 1µl da enzima *rTth* polimerase (2U/µl). Submeteu-se a reação aos ciclos apresentados na figura 11.

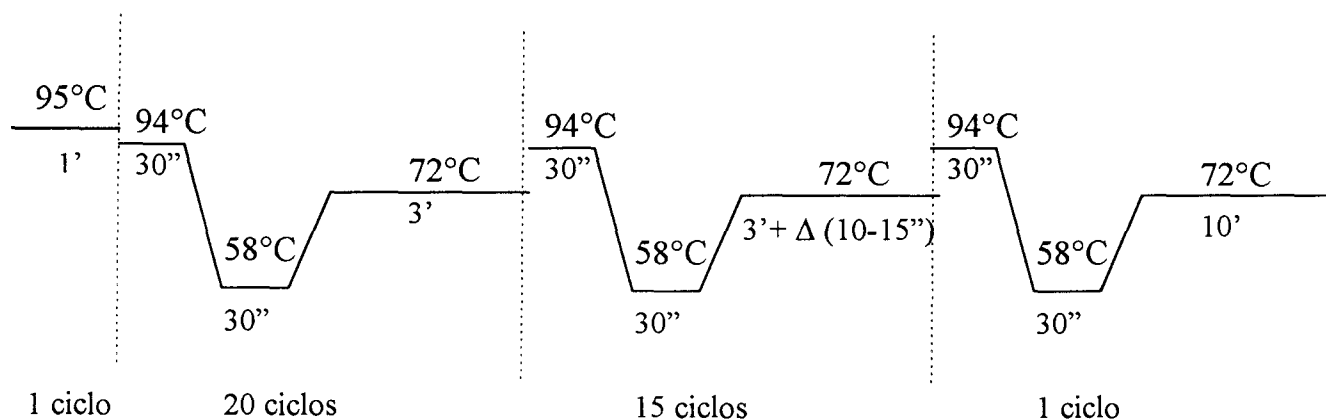


Figura 11 - Ciclos utilizados na amplificação de toda a região codificante do gene da **GALC**, (Δ) = auto-extensão.

a.4) Amplificação do transcrito menor

Um transcrito da proteína **GALC**, de menor tamanho, pode ser observado graças a um *splicing* alternativo que usa um sinal de poliadenilação dentro do intron 10. A amplificação desse cDNA menor pôde ser feita também pela técnica de PCR longo (*extra long PCR*). Tal procedimento permitiu a análise da distribuição do polimorfismo $C^{502} \rightarrow T$ em ambos os transcritos.

A partir do cDNA total, o cDNA de menor tamanho (1,2 kb) foi amplificado, utilizando o mesmo kit *GeneAmp XL PCR* (Perkin Elmer). O processo seguiu as mesmas condições de reação descritas no item anterior, para a amplificação de toda a região codificante, exceto pelo uso dos *primers* ATS (5'-CCA ATA GTA AAG AAG TGA GTT AAA CC - 3') e 1F (tabela 5).

b) Clonagem e sequenciamento:

b.1) Clonagem no vetor pCRII:

Os produtos de PCR foram clonados com o auxílio do kit *TA Cloning* (Invitrogen Corporation). O método se baseou na característica da *Taq* polimerase de adicionar uma simples desoxiadenosina (A) na extremidade 3' dos produtos de PCR. O vetor pCRII, que é fornecido pelo kit, e já linearizado, possui na região 3' terminal um resíduo de desoxitimidina (T) permitindo que inserto e vetor com extremidades abruptas se liguem eficientemente.

Para a clonagem do produto de PCR, obtido pela técnica de PCR longo, primeiramente adicionou-se a desoxiadenosina (A) na extremidade 3', uma vez que a enzima *rTth*, usada na amplificação de longos fragmentos, não possui a característica de adição da *Taq* polimerase.

Acrescentou-se, então, 0,5µl de *Taq* polimerase, para a adição da base A, ao produto de amplificação obtido pela enzima *rTth* e incubou-se a 72°C por 10 minutos. Procedeu-se uma extração com fenol, seguido de precipitação com etanol.

A reação de ligação foi feita da mesma forma para ambos os casos acima, como segue: 1µl tampão de ligação (Tris-HCl 60mM pH 7,5; MgCl₂ 60mM; NaCl 50mM; BSA 1mg/ml; β-mercaptoetanol 70mM; ATP 1mM; DTT 20mM; espermidina 10mM); 2µl vetor pCRII (25ng/µl); 1µl do produto da reação de PCR e 1µl enzima T4 DNA *ligase* (1U/µl) em um volume final de 10µl. Incubou-se a 14°C durante a noite.

Para transformação utilizou-se as células competentes fornecidas pelo kit *One Shot INVαF'*, cujo genótipo é o seguinte: F'*endA1 recA1 hsdR17(r_k⁻,m_k⁺) supE44 thi-1 gyrA96 relA1 φ80lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169 deoRλ⁻*. Os clones recombinantes foram selecionados pela resistência à ampicilina e pela expressão da β-galactosidase. O mapa do plasmídeo pCRII é mostrado na figura 12. A análise dos insertos foi feita por digestão com a enzima de restrição *Eco* RI.

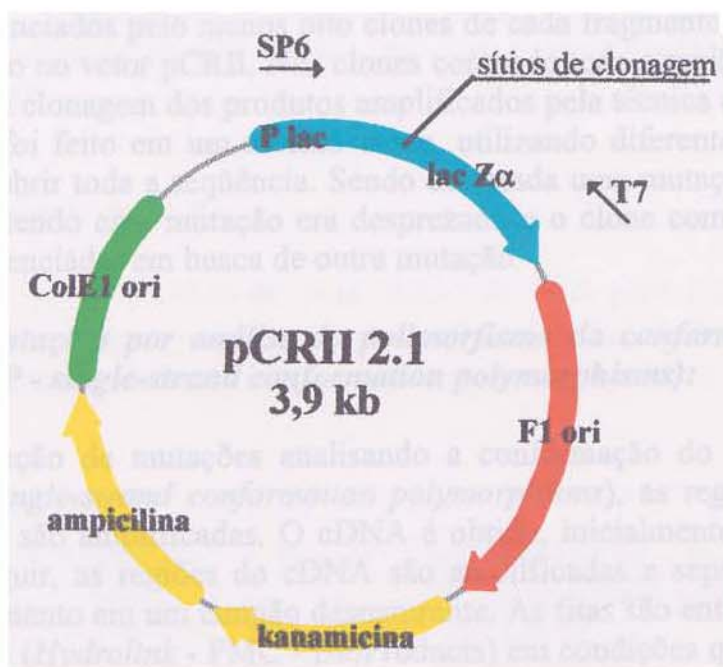


Figura 12 - Mapa do plasmídio pCRII

b.2) Sequenciamento:

As reações de sequenciamento seguiram o método de terminação de cadeia, usando didesoxinucleotídeos (ddNTP) descrito por Sanger (Sanger *et al.*, 1977), com o auxílio do kit de sequenciamento *Sequenase* (United States Biochemical - USB) .

Foram sequenciados pelo menos oito clones de cada fragmento amplificado e previamente clonado no vetor pCRII. Nos clones contendo toda a região codificante, obtidos por meio da clonagem dos produtos amplificados pela técnica de PCR longo, o sequenciamento foi feito em um mesmo clone, utilizando diferentes *primers* em cada reação para cobrir toda a sequência. Sendo detectada uma mutação em um dos alelos, o clone contendo essa mutação era desprezado e o clone com o outro alelo era totalmente sequenciado, em busca de outra mutação.

4- Detecção de mutações por análise do polimorfismo da conformação da fita simples (SSCP - single-strand conformation polymorphisms):

Para a detecção de mutações analisando a conformação do DNA em fita simples (SSCP - *single-strand conformation polymorphisms*), as regiões contendo possíveis mutações são amplificadas. O cDNA é obtido, inicialmente, pela técnica de RT-PCR. A seguir, as regiões do cDNA são amplificadas e separadas em fita simples por aquecimento em um tampão desnaturante. As fitas são então fracionadas em um gel de MDE (*Hydrolink* - FMC - BioProducts) em condições que permitem a detecção de uma única base alterada, baseado no fato de que tais mutações provocam mudanças conformacionais com conseqüente alteração na mobilidade eletroforética.

A fim de se cobrir, completamente, a sequência codificante da proteína GALC, o cDNA foi dividido em seis diferentes amplificações (figura 6). Como a probabilidade de se visualizar as mutações diminui com o aumento do tamanho do fragmento, estando na faixa de 80-100% para fragmentos de 200-300bp, cada pedaço foi dividido em duas partes, por digestão com enzimas específicas, resultando em subfragmentos de, em média 220 bp, conforme recomenda a técnica.

a) PCR (usando α - ^{32}P dNTP) para análise por SSCP:

O PCR foi realizado da mesma forma descrita anteriormente no item 3-a.2, com o auxílio do kit *PCR Optimizer Kit* (Invitrogen Corporation), exceto que, nesse caso, se utilizou, na mistura de dNTPs, um desoxinucleotídeo radioativamente marcado com ^{32}P . Adicionou-se 1 μCi α -[^{32}P]dCTP (atividade específica 3000Ci/mmol) à mistura de dNTPs (2mM), na qual a concentração do dCTP foi diminuída para 0,2mM.

b) Digestão dos produtos de PCR:

Utilizou-se 15 μl do produto de cada reação de PCR para digestão com 10 unidades de enzima, usando na reação um volume final de 30 μl . Cada fragmento foi digerido com a enzima específica conforme demonstra a tabela 6.

Tabela 6 - Posição dos 6 fragmentos amplificados para análise das mutações por SSCP.

Fragmento/ posição	Tamanho (bp)	Primer (seq. tab. 2)	Enzima/ posição	Tamanho (bp) subfragmentos
1/ -40 - 498	538	1F/1R	<i>Asc</i> I/266	257 - 279
2/ 440 - 812	372	2F/2R	<i>Hinf</i> I/690	204 - 167
3/ 705 - 1050	345	3F/3R	<i>Asc</i> I/920	168 - 177
4/ 985 - 1421	436	4F/4R	<i>Mbo</i> I/1244	229 - 225
5/ 1318 - 1671	353	5F/5R	<i>Mbo</i> I/1525	164 - 195
6/ 1609 - 2117	508	6F/6R	<i>Mbo</i> I/1808	150 - 241

A reação de digestão foi feita por duas horas à temperatura ideal para cada enzima, de acordo com a sua melhor atividade, sendo interrompida com 30 μl de solução tampão formamida 2X (0,05% azul de bromofenol; 0,05% xileno cianol; EDTA 20mM; diluídos em formamida desionizada).

c) Preparação do gel:

As placas com tamanho 40x40cm foram preparadas, sendo mantida uma das faces siliconizada. Um espaçador de 0,8mm de espessura foi utilizado. O gel foi preparado a partir de uma mistura não desnaturante composta de:

25ml de MDE

10ml de glicerol

6ml de TBE 10X (Tris-base 0,089M; ácido bórico 0,089M; 0,75g EDTA)

59ml de H₂O

Para polimerização, adicionou-se 400µl de persulfato de amônio 10% e 40µl de TEMED.

As amostras foram desnaturadas a 100°C por 2 minutos, e resfriadas imediatamente, no gelo, antes da corrida. Aplicou-se 3µl de cada reação no gel que foi submetido a eletroforese por 16-17 horas, a 7 watts em solução de TBE 0,5X.

Após esse período, foi feita a transferência para um papel Whatman 3MM, seco e exposto durante a noite em filme X-OMAT AR (Kodak *diagnostic film*), a -70°C e na presença de placas intensificadoras (Quanta III - Sigma).

5 - Determinação no DNA genômico da condição das mutações encontradas no cDNA:

Todas as mutações encontradas por sequenciamento dos fragmentos de cDNA foram, posteriormente, confirmadas e avaliadas com relação aos seus alelos no DNA genômico. Para isso, a região contendo a mutação a ser analisada foi amplificada a partir do DNA genômico pela técnica de PCR já descrita. Os *primers* utilizados nas amplificações do DNA genômico são mostrados na tabela 5 e na tabela 7. A figura 10 mostra a localização dos *primers* utilizados.

Tabela 7 - Sequências dos *primers* utilizados na amplificação do DNA genômico do gene da **GALC**.

PRIMER	SEQUÊNCIA (5'→3')
G1G	GGA AACGCAGGG CAA CAC CAC
G4R	CAT TTC TTA CCA ATG AGT GTA A
G4F	CTC TAT TCA GAC GGC ACT G
G5R	AAG TAC CAC AGA ATC AGA TTA TTT TC
G5FMut	TGA CCT GGA TTG TGC GCA CCA AG
G7R	CAT GCC TTA CCC TAT AAC A
G7F	ACT CCA AAA GAT ATT AAG AAA A
G8R	CAT ATA GCC ATT GAT ATA ATT CTG
G9R	TGA ACC ATA CCT GAT ACC CA
G9F	AAT CTT TTA GCA CAA TCG CAT G
G14R	ATT GAG AAC ATC AAT CTT AC
G14F	ATT TCT TAC ATT CTG AAC AG
G15F	IG ACC AAT CTG ACT A
G15M	TTT GCA GGA CCA ATC TGA GTA
G15R'	AGT CAC TTA GCT AAA TCA CCT G
G15R	TTA CAC TTC CTG CAA TGA ACA CAC
G17F	TCT ACT CTA GGG TCA TTT C
P1	CCT ATA TGG AAA ACA ATG TGG
P2	AAG GAG CTA ACA TTT CAG GC
P3	TCA AGT CCT TGA TGA TCA CC

As mutações foram confirmadas, no DNA genômico, por sequenciamento, análise de restrição ou hibridização com oligonucleotídeo específico.

a) Análise de restrição:

A confirmação da mutação por análise de restrição foi realizada, em alguns casos, quando a mutação envolvia perda ou ganho de algum sítio de restrição. Para a digestão, foram utilizados 15µl do produto de PCR e 10 unidades de enzima, em um volume final de 30µl. O tamanho dos fragmentos foi analisado em gel de agarose Metaphor (FMC - BioProducts) a 3%.

**b) Hibridização com oligonucleotídeo alelo-específico:
(ASOH - alelo-specific oligonucleotide hybridization)**

A confirmação de algumas mutações em DNA genômico foi feita utilizando-se a técnica de hibridização com oligonucleotídeo específico.

Esse método foi utilizado nos casos em que não havia perda ou ganho de qualquer sítio de restrição, quando a mutação situava-se em uma difícil região de amplificação, ou ainda quando os *primers* para a amplificação do DNA genômico não eram disponíveis.

A técnica que utiliza o aparelho de *slot-blot* foi realizada conforme instruções do fabricante. O DNA genômico foi amplificado com *primers* específicos, de acordo com a mutação encontrada. Aproximadamente 5µl do produto do PCR em 800µl de uma solução desnaturante (NaOH 0,4N; EDTA 25 mM), foram aplicados em membrana de Nylon *Immobilon S* (Millipore).

A membrana foi pré-hibridizada por pelo menos 4 horas em uma solução de pré-hibridização (4XSSC; 5X Denhart's; NaH₂PO₄ 10mM; ssDNA 3µg/µl; SDS 1%).

A marcação dos oligonucleotídeos, normal e mutante, foi feita segundo a reação:

1µl do oligonucleotídeo mutante ou normal (0,12µg/µl)

2µl tampão 10X (Tris-HCl 700mM pH 7,6; MgCl₂ 100mM; DTT 50mM)

16µl H₂O

1µl enzima T4 *Polinucleotídeoquinase* 10U/µl

1µl [δ^{32} P]dATP 10mCi/ml

Incubou-se a 37°C por, pelo menos, 1 hora. A reação foi então adicionada a uma solução de hibridização (4XSSC; 10mM NaH₂PO₄; 3µg/µl ssDNA; 1% SDS).

A hibridização foi feita a 42°C por 16 a 20 horas. Foram preparados simultaneamente, dois filtros e cada um foi hibridizado com os oligonucleotídeos mutante e normal.

A lavagem dos filtros foi feita da seguinte forma:

- 1 - Solução de 6XSSC por 20 minutos a temperatura ambiente;
- 2 - Solução de 6XSSC/0,1% SDS por 10 minutos à temperatura de acordo com o T_M de cada oligonucleotídeo.
- 3 - Solução de 6XSSC por 1 minuto a temperatura ambiente.

Os filtros foram então secos e expostos em filme X-OMAT AR (Kodak *diagnostic film*) na presença de placas intensificadoras (Quanta III - Sigma) por, pelo menos, 4 horas, a -70°C.

A seqüências dos *primers* utilizados na hibridização, bem como as temperaturas de lavagem dos filtros, são mencionados na apresentação dos resultados.

c) Sequenciamento do DNA genômico:

Em alguns casos, as mutações encontradas em cDNA foram analisadas no DNA genômico pela técnica de sequenciamento descrita previamente. Para isso, o exon de interesse foi amplificado e clonado para ser sequenciado.

6 - Análise de alterações no gene previamente descritas:

a) Polimorfismo C⁵⁰²→T:

A detecção do polimorfismo C⁵⁰²→T pode ser feita por ASOH ou pelo método descrito por Rafi e colaboradores (1995). A maioria das análises realizadas neste trabalho foram feitas pela técnica de ASOH. No método de Rafi se utiliza um *primer* inverso (G5R) e um outro direto (G5FMut), no qual duas mutações foram acrescentadas a fim de se criarem os sítios de restrição *Dra* III (CACNNN↓GTG) e *Mwo* I (GCNNNNN↓NNGC), quando uma ou outra base (T ou C) estiverem presentes.

Dessa forma, o produto de amplificação de 135 bp é digerido por *Dra* III se a base T estiver na posição 502. Se a base C estiver nessa posição, o produto digere com *Mwo* I, como pode ser visualizado na figura 13. A sequência dos *primers* é mostrada na tabela 7 e a posição na sequência na figura 10.

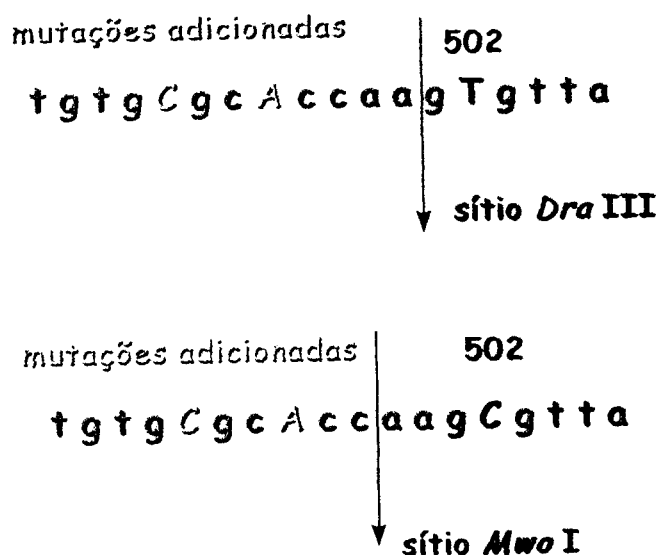


Figura 13 - Análise do polimorfismo $C^{502} \rightarrow T$.

b) Polimorfismo $T^{1637} \rightarrow C$:

Esse polimorfismo também pode ser analisado pelo método de ASOH, ou segundo o método simples e rápido descrito por De Gasperi e colaboradores (1996). Nesse método, da mesma forma que no polimorfismo na posição 502, se adicionou uma mutação em um dos *primers* (G15M), utilizado juntamente com outro *primer* inverso (G15R). A sequência dos *primers* é mostrada na tabela 7 e a localização na figura 10. Essa base alterada insere um sítio de restrição *Rsa* I (GT↓AC) quando a base C está presente na sequência. Quando a base T está presente, o produto não é digerido, como mostra a figura 14.

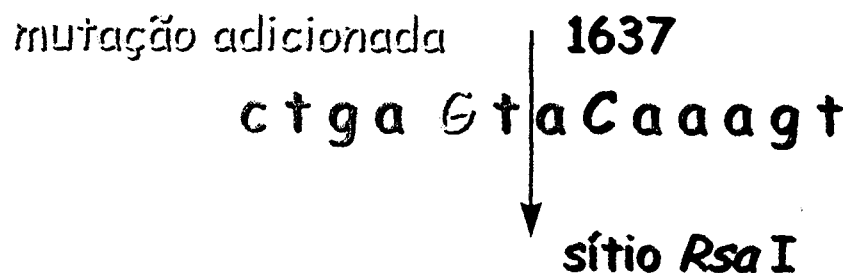


Figura 14 - Análise do polimorfismo $C^{1637} \rightarrow T$.

c) Análise da deleção:

A análise da deleção após o exon 10, com conseqüente associação ao polimorfismo $C^{502} \rightarrow T$ foi feita com base no método descrito por Luzi *et al.*, 1995. Nesse método são utilizados três *primers* (sequências mostradas na tabela 7), um *primer* direto, localizado antes do ponto de deleção (P1) e dois *primers* inversos, um complementar à sequência não deletada normal (P2), localizado após o ponto de deleção, e outro complementar a sequência presente no alelo com deleção mutante (P3), como mostra a figura 15.

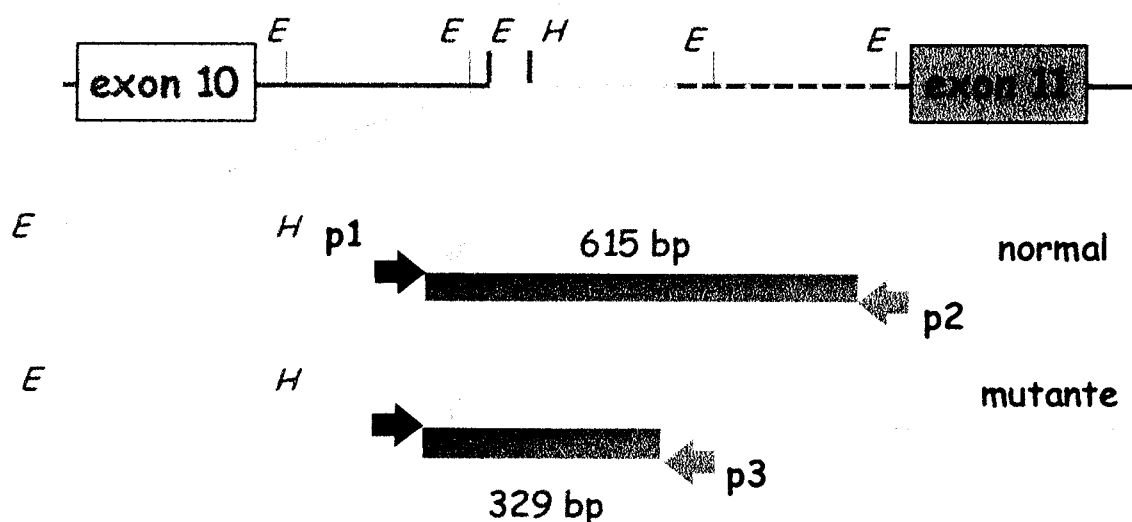


Figura 15 - Localização dos *primers* P1, P2 e P3, determinação da deleção após exon 10, (E = *Eco* RI; H = *Hind* III).

d) Análise do polimorfismo associado à deleção ($C^{502} \rightarrow T/\text{del}$):

Estudos do polimorfismo $C^{502} \rightarrow T$ associado à deleção, quanto ao nível de transcrição, foram realizados pela amplificação dos dois transcritos (menor e normal) de um mesmo indivíduo, seguida de hibridização com oligonucleotídeos normal (502C- 5'-CGC CCA AGC GTT ACC ATG-3') e mutante (502T - 5'-CGC CCA AGT GTT ACC ATG-3').

e) Análise do nível de expressão:

Essa análise foi aplicada especificamente no estudo de uma família, na qual foi encontrada uma mutação ($G^{147} \rightarrow C$), onde o sítio de *splicing* era alterado provocando a inserção de 126 bp no mRNA. O nível de expressão desse alelo foi estudado de forma indireta.

A partir do cDNA de todos os indivíduos da família em questão, foi amplificado o seguimento do mRNA (exon 1 $\rightarrow$ parte do exon 4), correspondente à região na qual se situava a mutação, utilizando os *primers* para amplificação do fragmento #1 (1F e 1R - tabela 5).

Os fragmentos obtidos de ambos os alelos, isto é, com e sem a inserção de 126 bp, foram separados em gel de agarose 2% e transferidos para um filtro de Nylon *Immobilon S* (Millipore), pelo método de Southern (1986).

O filtro foi, então, hibridizado com oligonucleotídeos marcados. Os dois oligonucleotídeos usados foram, o denominado G1G (seqüência presente dentro da inserção de 126 bp), enquanto o outro continha a seqüência normal com relação à mutação na posição 283 (283N - ATT CAG A C GCA CTG AG).

Resultados

1- Alterações encontradas

Foram encontradas no gene que codifica a proteína **GALC**, cuja deficiência resulta no fenótipo da doença de Krabbe, 7 novas mutações de ponto, uma mutação silenciosa que altera o sítio de *splicing* do exon 1, a deleção de uma simples base (delG), uma inserção de 34 bp, além de uma nova região polimórfica na posição 1873. Foram estudadas as regiões polimórficas previamente descritas nas posições 502 e 1637. O polimorfismo C⁵⁰²→T, associado à deleção após o exon 10 (C⁵⁰²→T/del), foi encontrado em 50% das famílias estudadas. A tabela 8 apresenta um resumo de todas essas alterações.

Tabela 8 - Alterações encontradas no gene da GALC.

	Nucleotídio	Aminoácido	Exon	Método de detecção
1	C ²⁰ →A	Ser ⁷ →stop	1	Sequenciamento
^b 2	G ¹⁴⁷ →C	Gly ⁴⁹ →Gly	1	- <i>Hph</i> I
3	G ²⁸³ →A	Gly ⁹⁵ →Ser	4	ASOH
4	A ³⁰¹ →T	Met ¹⁰¹ →Leu	4	- <i>Nsi</i> I
^a 5	C ⁵⁰² →T + deleção	Arg ¹⁶⁸ →Cys	5/11-17	ASOH/- <i>Dra</i> III/PCR
^a 6	C ⁵⁰² →T	Arg ¹⁶⁸ →Cys	5	ASOH/- <i>Dra</i> III
7	inserção 34 bp G ⁵⁷³	inserção Val-Phe-Gly-Gly→stop	6/7	Sequenciamento
8	G ⁶⁴³ →A	Glu ²¹⁵ →Lys	7	- <i>Hinf</i> I
^c 9	deleção G ⁸⁰⁵	frameshift	8	- <i>Cac8</i> I
10	G ⁸⁰⁹ →A	Gly ²⁶⁹ →Ser	8	- <i>Fnu</i> 4HI
11	A ⁸⁹³ →G	Tyr ²⁹⁸ →Cys	9	ASOH
12	G ¹⁶⁰⁹ →A	Gly ⁵³⁷ →Arg	14	ASOH
^a 13	C ¹⁶³⁷ →T	Thr ⁵⁴⁶ →Ile	15	ASOH/- <i>Rsa</i> I
14	G ¹⁸⁷³ →A	Ala ⁶²⁵ →Thr	17	ASOH

(-) perda do sítio de restrição; (a) alterações previamente descritas; (b) alteração no sítio de *splicing*; (c) mudança no quadro de leitura.

2 - Resumo das alterações encontradas em cada indivíduo

A tabela 9 mostra as alterações e os polimorfismos estudados nos indivíduos com deficiência da atividade da **GALC**, enquanto na tabela 10 são apresentados o genótipo dos 46 indivíduos estudados.

Tabela 9 - Genótipo dos pacientes com relação às mutações no gene da **GALC**.

FAMÍLIA (origem étnica)	PACIENTES	MUTAÇÃO alelo1/alelo2	POLIMORFISMOS alelo1/ alelo2		
			502	1637	1873
1 (Indiano)	2 (F)	G ⁶⁴³ →A	C	C	G
	3 (M)	C ⁵⁰² →T/del	T		
2 (Irlandês, Alemão Italiano)	8 (F)				
	9 (M)	805delG	C	C	G
	10(M)	C ⁵⁰² →T/del	T		
3 (Irlandês, Inglês, Nativo Norte Americano)	13 (F)	805delG	C	C	G
		C ⁵⁰² →T/del	T		
4 (Irlandês, Inglês, Francês, Nativo Norte Americano)	20 (F)	A ⁸⁹³ →G	C	C	G
		C ⁵⁰² →T/del	T		
5 (Polonês)	(25)M	C ²⁰ →A	T	C	G
		A ³⁰¹ →T	C	C	G
6 (Italiano)	(26)F	G ⁸⁰⁹ →A	C	C	G
		G ¹⁶⁰⁹ →A	C	C	A
(Afro-Americano)	42 (M)	G ¹⁴⁷ →C	C	C	G
	43 (F)	G ²⁸³ →A	C	T	G
8 (Inglês, Alemão, Norueguês)	45 (M)	G ²⁸³ →A	C	C	G
	46 (M)	573ins(34)	C	C	G

(M) masculino, (F) feminino.

Tabela 10 - Genótipos de todos os indivíduos estudados com relação ao gene da GALC

FAMÍLIA	INDIVÍDUO	ALELO 1	ALELO 2
1	(1)M	1637C/1873G	643A/1637C/1873G
	(2)P	502T/del/1873G	643A/1637C/1873G
	(3)P	502T/del/1873G	643A/1637C/1873G
	(4)I	1637C/1873G	1637T/1873G
	(5)F	502T/del/1873G	1637T/1873G
2	(6)M	502T/del/1873G	1637C/1873G
	(7)I	502T/del/1873G	1637C/1873G
	(8)I	502T/del/1873G	805delG/1637C/1873G
	(9)P	502T/del/1873G	805delG/1637C/1873G
	(10)P	502T/del/1873G	805delG/1637C/1873G
	(11)F	1637T/1873G	805delG/1637C/1873G
3	(12)M	502T/del/1873G	1637C/1873G
	(13)P	502T/del/1873G	805delG/1637C/1873G
4	(14)M	502T/del/1873G	1637C/1873G
	(15)I	502T/del/1873G	1637T/1873G
	(16)I	1637C/1873G	1637T/1873G
	(17)I	502T/del/1873G	1637T/1873G
	(18)I	502T/del/1873G	1637T/1873G
	(19)I	1637C/1873G	1637T/1873G
	(20)P	502T/del/1873G	893G/1637C/1873G
	(21)I	1637C/1873G	1637T/1873G
	(22)I	502T/del/1873G	1637T/1873G
	(23)I	502T/del/1873G	1637T/1873G
	(24)F	1637T/1873G	893G/1637C/1873G
5	(25)P	20A/502C/1637C/1873G	301T/1637C/1873G
6	(26)P	809A/1637C/1873G	1609A/1637T/*1873A
	(27)I	1637C/1873G	1637T/1873G
	(28)S	809A/1637C/1873G	1637T/1873G
	(29)S	809A/1637C/1873G	1637T/1873G
	(30)S	1637C/1873G	1609A/1637T/*1873A
	(31)S	1637T/1873G	1609A/1637T/*1873A
	(32)S	809A/1637C/1873G	1637C/1873G
	(33)S	809A/1637C/1873G	1637T/1873G
	(34)N	809A/1637C/1873G	1637T/1873G
	(35)N	1637C/1873G	1637T/1873G
	(36)N	809A/1637C/1873G	1637T/1873G
	(37)N	1637C/1873G	1637T/1873G
	(38)N	1637C/1873G	1609A/1873G
	(39)NC	1637C/1873G	1637T/1873G
7	(40)M	147C/1637C/1873G	1637C/1873G
	(41)MI	1637C/1873G	1637C/1873G
	(42)P	147C/1637C/1873G	283A/1637C/1873G
	(43)P	147C/1637C/1873G	283A/1637C/1873G
	(44)F	1637T/1873G	283A/1637C/1873G
8	(45)P	283A/1637C/1873G	573ins(34bp)/1637C/1873G
	(46)P	283A/1637C/1873G	573ins(34bp)/1637C/1873G

(M) mãe; (F) pai; (P) paciente; (I) irmão; (S) filho; (N) neto; (NC) não consanguíneo (MI) meio irmão (com relação aos pacientes). Em negrito as alterações não polimórficas: (*) novo polimorfismo.

A figura 16 esquematiza e localiza as novas mutações encontradas no gene. Nessa figura também são mostradas as mutações descritas previamente. As alterações encontradas neste trabalho e que já tinham sido descritas, foram os polimorfismos nas posições 502 e 1637.

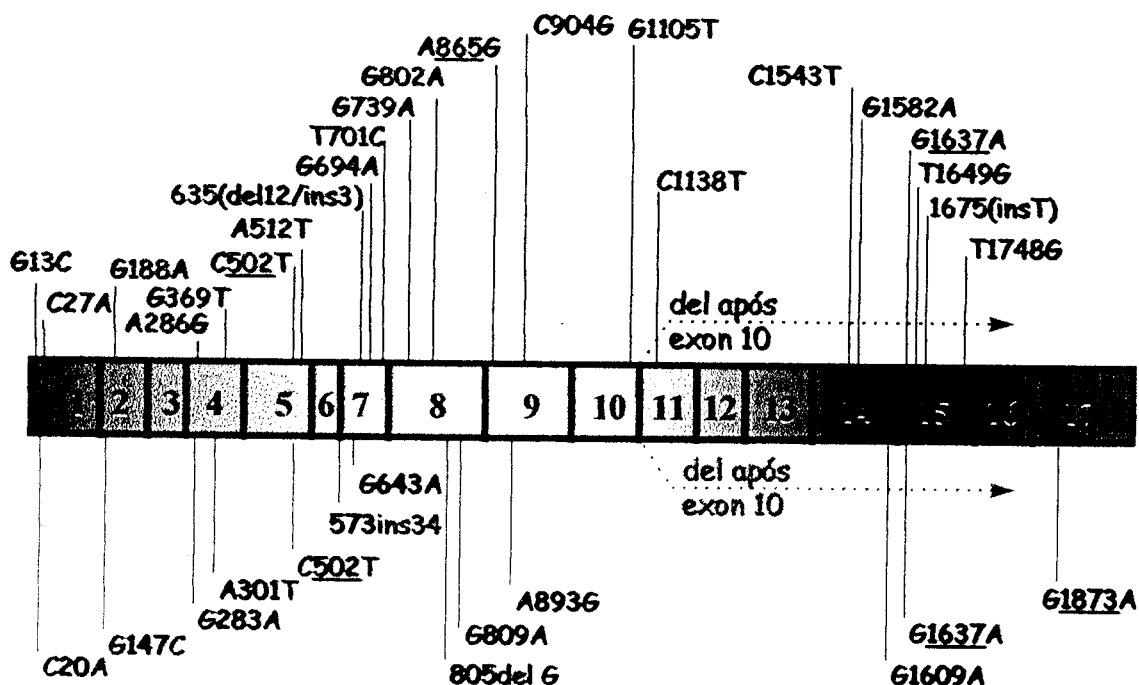


Figura 16 - Localização das mutações encontradas (acima) e das descritas anteriormente (embaixo), no gene da GALC. As regiões polimórficas se apresentam sublinhadas.

3 - Análise das alterações no gene da GALC

As mutações foram observadas, primeiramente, pelo sequenciamento do cDNA. As diferentes alterações encontradas no gene da **GALC** são mostradas nas fotos dos géis de sequenciamento (figuras 17 e 18) .

A confirmação, assim como a demonstração da condição alélica dessas mutações, em DNA genômico, foi obtida a partir de diferentes técnicas. A análise de restrição foi utilizada quando a mutação provocava perda ou ganho de algum sítio de restrição, caso contrário, era empregada a técnica de ASOH, ou mesmo o sequenciamento do +-DNA genômico. As tabelas 11, 12 e 13 classificam as mutações de acordo com a técnica utilizada no estudo do DNA genômico. As seqüências dos *primers* utilizados na amplificação são mostrados nas tabelas 5 e 7 dos métodos e sua localização na figura 10.

Tabela 11 - Mutações estudadas por análise de restrição.

MUTAÇÃO	<i>Primers</i> (amplificação)	PCR - temperatura de anelamento (°C)	Enzima utilizada
G ¹⁴⁷ → C	1F/1G	65	<i>Hph</i> I
A ³⁰¹ → T	G4R/G4F	55	<i>Nsi</i> I
C ⁵⁰² → T	G5R/G5FMut	52	<i>Dra</i> III/ <i>Mwo</i> I
G ⁶⁴³ → A	G7R/G7F	55	<i>Hinf</i> I
805delG	G8R/3F	55	<i>Cac8</i> I
G ⁸⁰⁹ → A	G8R/3F	55	<i>Fnu</i> 4HI.
C ¹⁶³⁷ → T	G15M/G15R'	55	<i>Rsa</i> I

Tabela 12 - Mutações analisadas por sequenciamento.

Mutação	<i>Primers</i> (amplificação)	PCR - temperatura de anelamento (°C)	<i>Primers</i> (sequenciamento)
C ²⁰ → A	G1G/1F	55	SP6/T7 (fig.11)
573ins(34bp)	1F/6R (cDNA)	58	2F/2R

Tabela 13 - Mutações estudadas pela técnica de ASOH.

Mutação	<i>Primers</i> (amplificação)	PCR-temperatura de anelamento (°C)	<i>Primers</i> usados na hibridização (N - normal; M - mutante) 5'→3'	Temperatura lavagem (°C)
G ¹⁴⁷ →C	1R/1F	60	N-GCG GCG GGG CAA CCT C M-GCG GCG GCG CAA CCT C	58
G ²⁸³ →A	G4R/G4F	55	N-ATT CAG ACG GCA CTG AG M-ATT CAG ACA GCA CTG AG	53
C ⁵⁰² →T	G15R/G15F	55	N-CGC CCA AGC GTT ACC ATG M-CGC CCA AGT GTT ACC ATG	54
A ⁸⁹³ →G	G9R/G9F	55	N-TGA TTA CTA TGA ACA GT M-TGA TTA CTG TGA ACA GT	45
G ¹⁶⁰⁹ →A	G14R/G14F	55	N-GTA TTA TAG GAG ACT AG M-GTA TTA TAA GAG ACT AG	45
C ¹⁶³⁷ →T	G15R/G15F	55	N-TCT GAC TAT AAA GTG TG M-TCT GAC TAC AAA GTG TG	47
G ¹⁸⁷³ →A	G17F/6R	55	N-GTC ATT TCG CCT CTG GC M-GTC ATT TCA CCT CTG GC	53

Em negrito a posição das mutações.

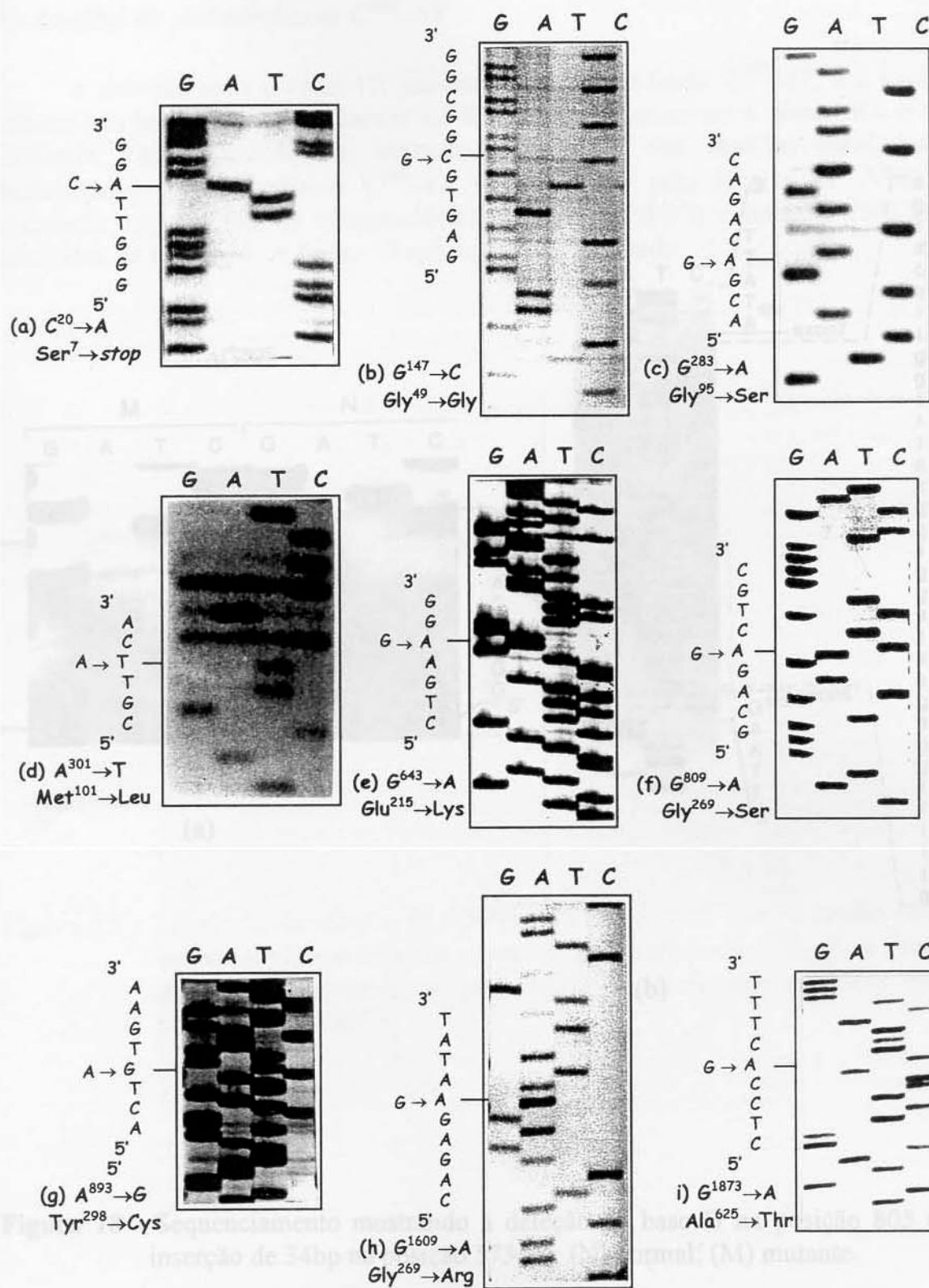


Figura 17 - Sequenciamento mostrando as alterações encontradas no gene da GALC.

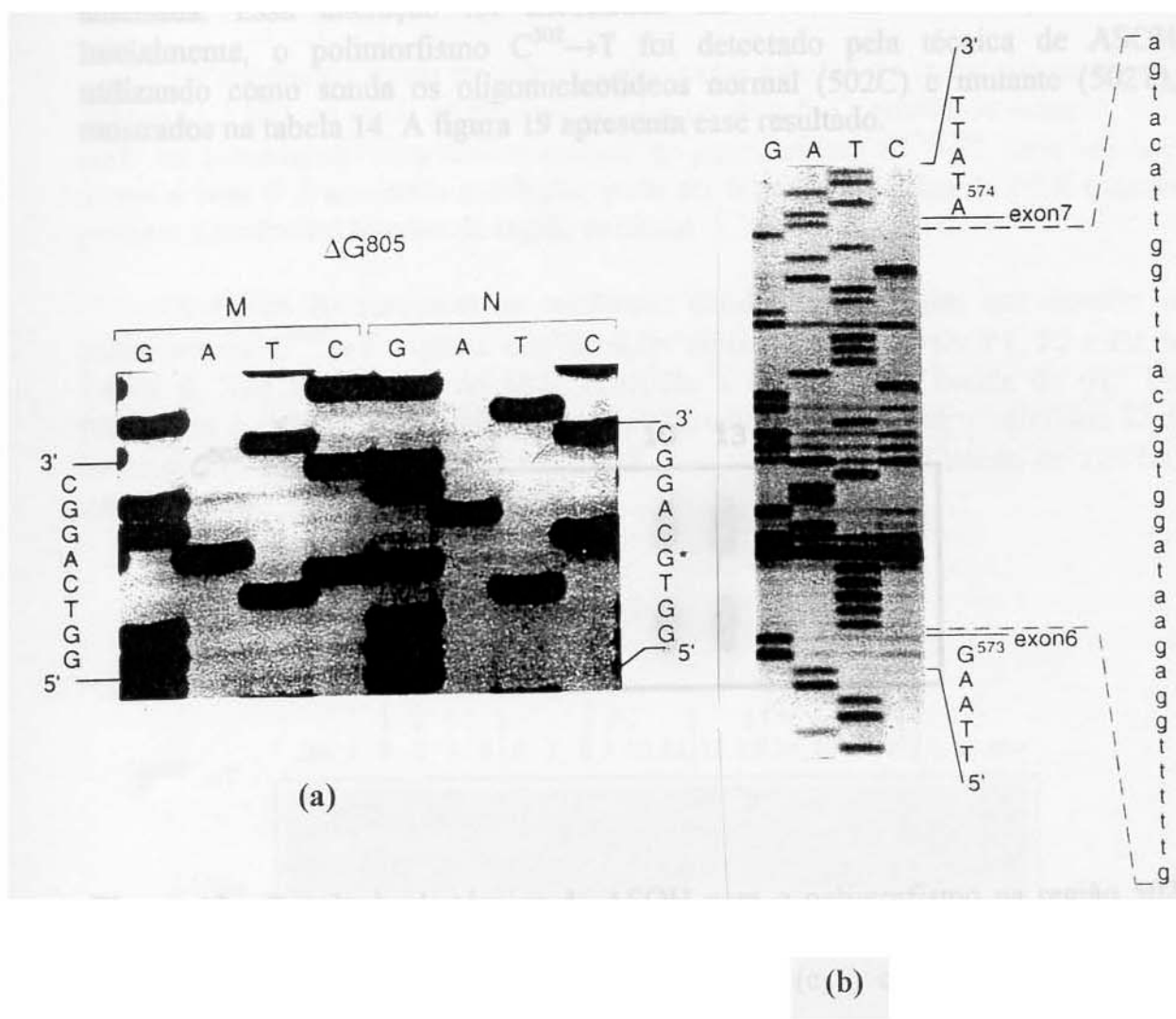


Figura 18 - Sequenciamento mostrando a deleção da base G na posição 805 (a) e a inserção de 34bp na posição 573 (a); (N) normal; (M) mutante.

4 - Análise do polimorfismo $C^{502} \rightarrow T$

A deleção após o exon 10, associada ao polimorfismo $C^{502} \rightarrow T$, é a mais comum nos indivíduos com doença de Krabbe e, portanto, foi a primeira a ser analisada. Essa alteração foi encontrada em 50% das famílias estudadas. Inicialmente, o polimorfismo $C^{502} \rightarrow T$ foi detectado pela técnica de ASOH utilizando como sonda os oligonucleotídeos normal (502C) e mutante (502T), mostrados na tabela 14. A figura 19 apresenta esse resultado.

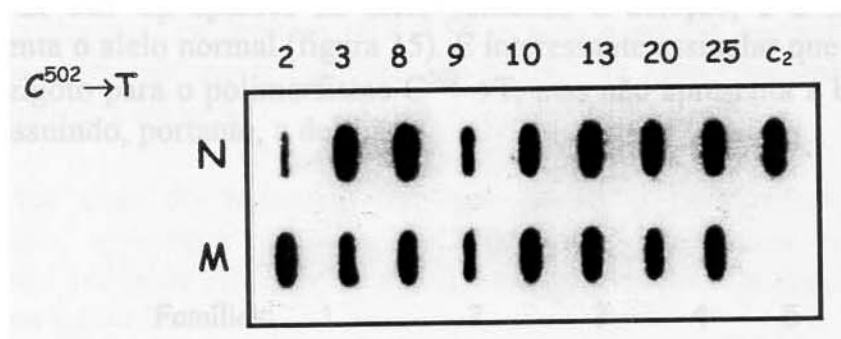


Figura 19 - Resultado da técnica de ASOH para o polimorfismo na região 502. Indivíduos heterozigotos para o polimorfismo $C^{502} \rightarrow T$ e com deficiência na atividade da **GALC**; (c₂) controle negativo; (N) normal; (M) mutante.

5 - Análise da deleção

Os indivíduos que apresentavam, pelo menos, um alelo contendo o polimorfismo $C^{502} \rightarrow T$, foram analisados quanto à deleção pela técnica descrita por Luzi (1995a).

Os resultados foram complementados pelos estudos do transcrito menor de mRNA (1,2 kb), os quais serão apresentados no item 6. O estudo da deleção, que pode ser considerado uma análise indireta do polimorfismo $C^{502} \rightarrow T$, uma vez que nunca a base C é associada à deleção, pode ser feito pela técnica de PCR usando *primers* situados no interior da região deletada.

A figura 20 apresenta os resultados obtidos nas famílias que contêm o polimorfismo $C^{502} \rightarrow T$. Após a amplificação, utilizando os *primers* P1, P2 e P3, a banda de 329 bp aparece no alelo contendo a deleção, e a banda de 615 bp representa o alelo normal (figura 15). É interessante assinalar que o indivíduo 25 é heterozigoto para o polimorfismo $C^{502} \rightarrow T$, mas não apresenta a banda de 329 bp, não possuindo, portanto, a deleção.

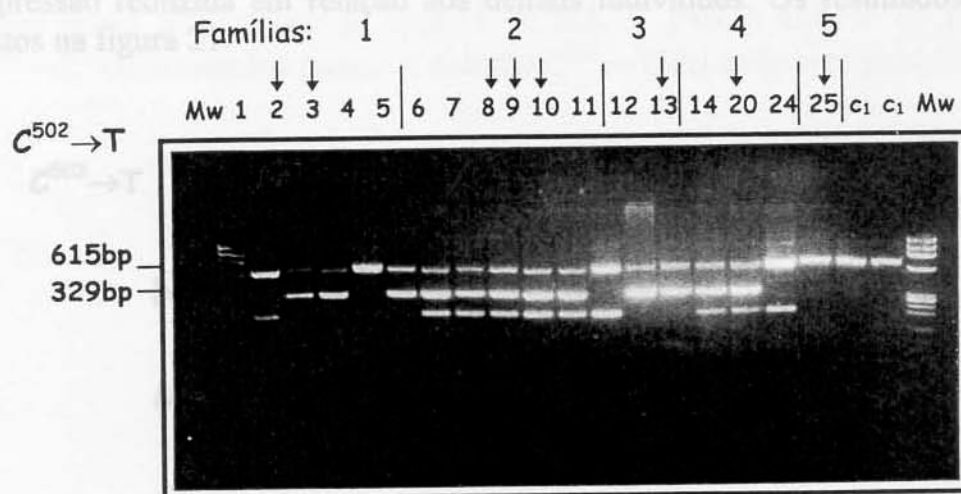


Figura 20 - Produtos do PCR com os *primers* P1, P2 e P3. (↓) Indivíduos com polimorfismo $C^{502} \rightarrow T$ e deficiência na atividade da GALC; (c₁) controle negativos; (Mw) marcador de peso molecular.

7 - Estudo das famílias

6 - Análise do transcrito menor (mRNA de 1,2 kb)

O sítio de poliadenilação alternativo no intron 10, que gera um mRNA de menor tamanho, foi descrito previamente por Sakai e colaboradores (1994). Esse mRNA foi amplificado pela técnica de PCR longo (*extra long PCR*) usando o *primer* 1F e o *primer* ATS.

A expressão dessa outra forma de mRNA de menor tamanho em indivíduos com a $C^{502} \rightarrow T/\text{del}$, pode ser observada por ASOH. A partir do cDNA, foram amplificados as duas formas de mRNA, ou seja, o mRNA contendo toda a região codificante e o mRNA menor, que utiliza o referido sítio de poliadenilação alternativo. Essas amplificações foram feitas simultaneamente, a fim de se comparar indiretamente, pela intensidade das bandas obtidas o nível de expressão dos dois mRNA para um mesmo indivíduo. Para a amplificação do transcrito menor utilizou-se os *primers* 1F e ATS, e para o mRNA normal, os *primers* 1F e 6R. Foi observada maior expressão do mRNA de menor tamanho nos indivíduos que possuem a mutação $C^{502} \rightarrow T/\text{del}$.

No caso do indivíduo 25, que possui o polimorfismo $C^{502} \rightarrow T$ sem, entretanto, apresentar a deleção, esse mRNA de menor tamanho tem sua expressão reduzida em relação aos demais indivíduos. Os resultados podem ser vistos na figura 21.

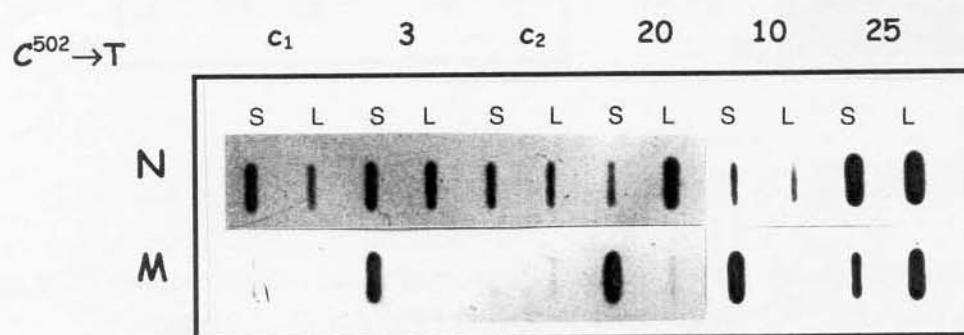


Figura 21 - Distribuição do polimorfismo $C^{502} \rightarrow T$ nas duas formas de mRNA transcritos pelo gene da GALC. (N) normal; (M) mutante; (S) transcrito menor; (L) transcrito normal; (c₁) indivíduo normal - controle negativo para o polimorfismo $C^{502} \rightarrow T$; (c₂) indivíduo com doença de Krabbe, mas negativo para o polimorfismo $C^{502} \rightarrow T$; (3)-(10)-(20) indivíduos com o polimorfismo $C^{502} \rightarrow T/\text{del}$; (25) indivíduo com o polimorfismo $C^{502} \rightarrow T$ sem a deleção.

7 - Estudo das famílias

a) Família 1

Essa família apresenta dois irmãos afetados pela doença de Krabbe. Em tais indivíduos, as alterações encontradas no gene da **GALC**, foram o polimorfismo $C^{502} \rightarrow T$, associado à deleção após o exon 10, e a mutação $G^{643} \rightarrow A$. A mutação $C^{502} \rightarrow T/\text{del}$ foi analisada em DNA genômico pela técnica de ASOH e pela técnica descrita por Rafi e colaboradores (1995) quanto à deleção. A mutação $G^{643} \rightarrow A$ foi estudada por análise de restrição do DNA genômico de todos os indivíduos do núcleo familiar.

A mutação $G^{643} \rightarrow A$ determina a perda do sítio de restrição *Hinf* I ($G \downarrow AGTC \rightarrow AAGTC$). Dessa forma, o DNA genômico dos indivíduos que contêm pelo menos um alelo com a mutação, mostra o padrão heterozigoto com metade do seu DNA não digerido. O exon 7, onde se situa a mutação, foi amplificado a partir do DNA genômico usando os *primers* G7F e G7R. O produto de amplificação desse exon é de 151 bp. Como esse fragmento somente possui um sítio *Hinf* I, o alelo mutado irá apresentar a banda de 151 bp, ou seja, o indivíduos heterozigotos apresentam a banda de 151 bp, e outras duas bandas de 79 e 72 bp, resultado da digestão com *Hinf* I. A figura 22 mostra os resultados obtidos da digestão do exon 7 amplificado do DNA genômico dos indivíduos da família 1, assim como o resultado da técnica de ASOH para a análise do polimorfismo $C^{502} \rightarrow T$. Os resultados quanto à deleção $C^{502} \rightarrow T/\text{del}$ estão na figura 20.

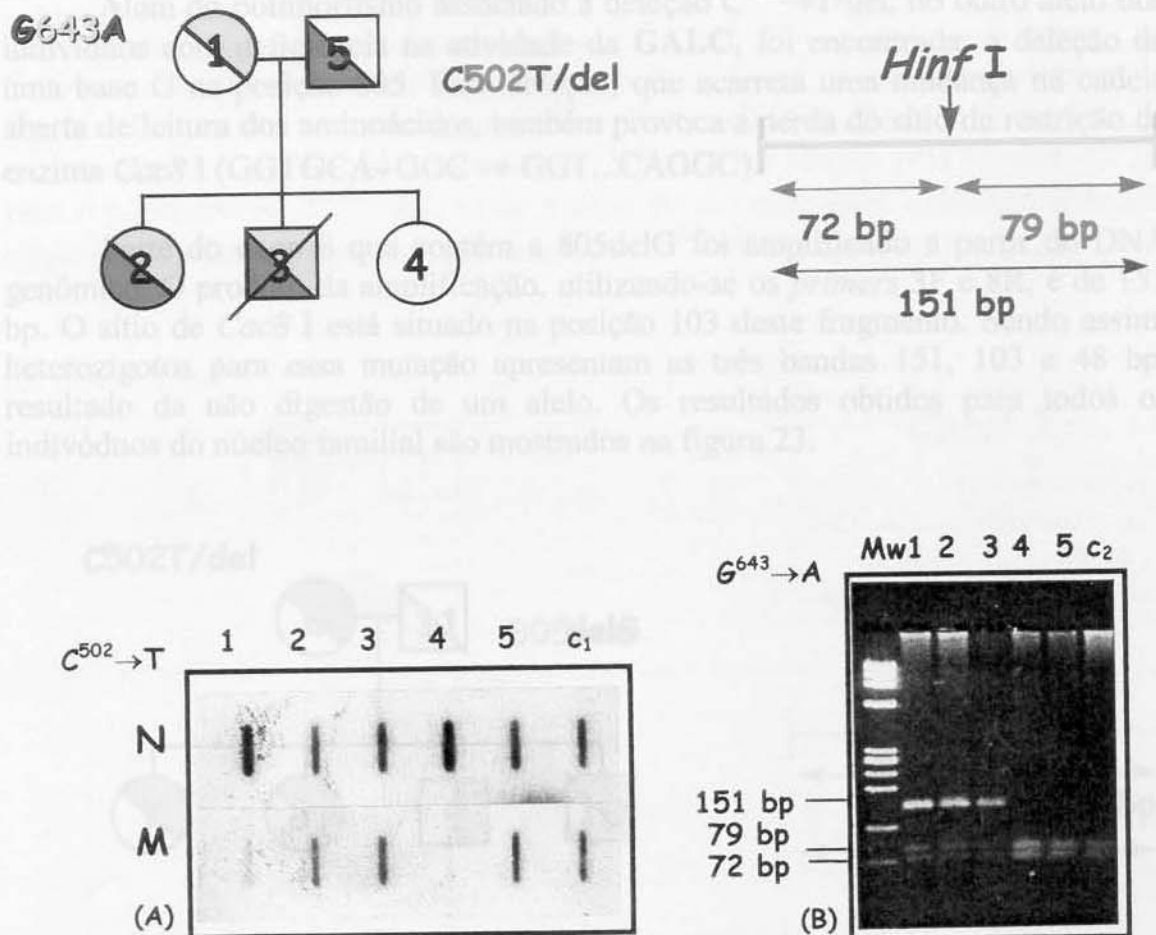


Figura 22 - Resultados das alterações encontradas no gene da **GALC** para a família 1. (A) ASOH para o polimorfismo $C^{502} \rightarrow T$; (B) Análise de restrição para a mutação $G^{643} \rightarrow A$; (c_1) controle positivo; (c_2) controle negativo; (N) normal; (M) mutante; (Mw) marcador de peso molecular.

b) Família 2

Além do polimorfismo associado à deleção $C^{502} \rightarrow T/\text{del}$, no outro alelo dos indivíduos com deficiência na atividade da **GALC**, foi encontrada, a deleção de uma base G na posição 805. Essa deleção, que acarreta uma mudança na cadeia aberta de leitura dos aminoácidos, também provoca a perda do sítio de restrição da enzima *Cac8* I ($\text{GGTGCA} \downarrow \text{GGC} \rightarrow \text{GGT} \dots \text{CAGGC}$).

Parte do exon 8 que contém a 805delG foi amplificado a partir do DNA genômico. O produto da amplificação, utilizando-se os *primers* 3F e 8R, é de 151 bp. O sítio de *Cac8* I está situado na posição 103 deste fragmento. Sendo assim, heterozigotos para essa mutação apresentam as três bandas 151, 103 e 48 bp, resultado da não digestão de um alelo. Os resultados obtidos para todos os indivíduos do núcleo familiar são mostrados na figura 23.

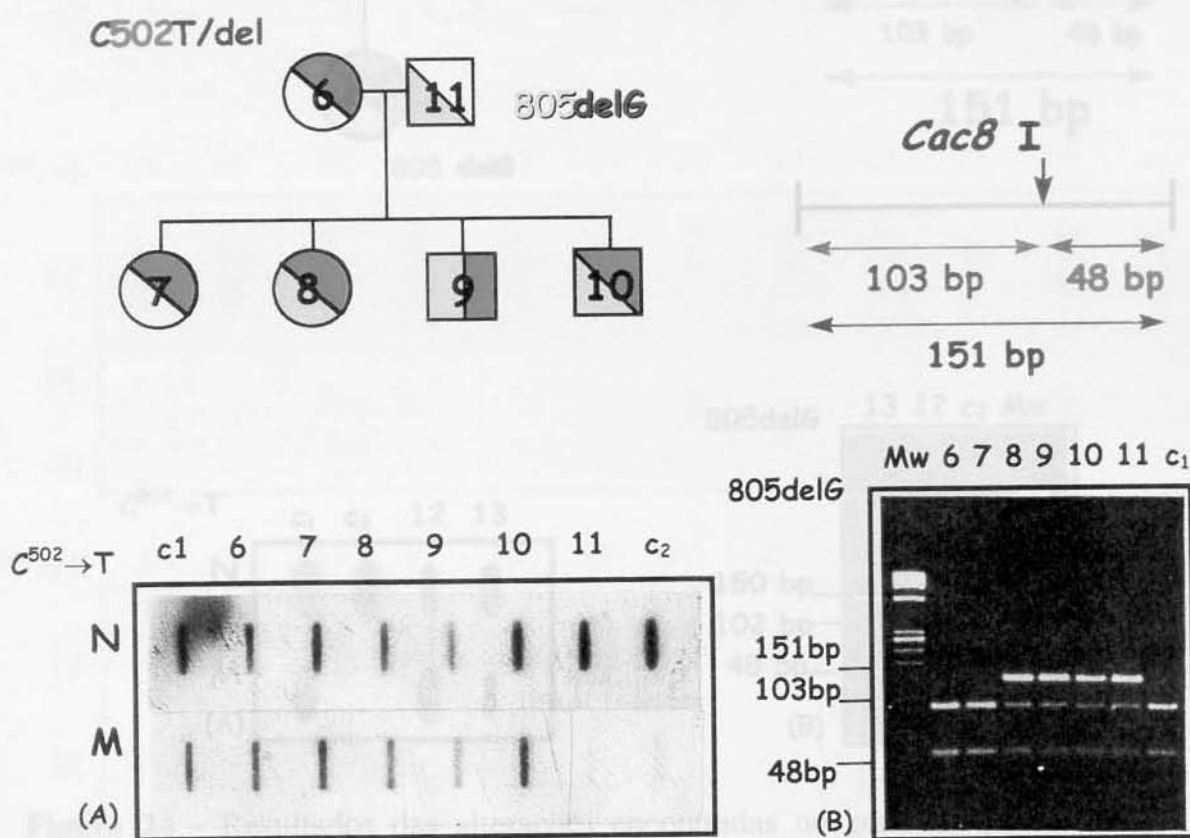


Figura 23 - Resultados das alterações encontradas no gene da **GALC** para a família 2. (A) ASOH para o polimorfismo $C^{502} \rightarrow T$; (B) Análise de restrição para a deleção 805delG; (c₁) controle positivo; (c₂) controle negativo; (Mw) marcador de peso molecular.

c) Família 3

Nesse caso somente foram analisados o indivíduo afetado pela doença de Krabbe e sua mãe, não sendo possível obter material dos outros membros da família. Foi encontrada a mutação $C^{502} \rightarrow T/\text{del}$, além da deleção 805delG, o mesmo genótipo observado na família 2. Os indivíduos foram pela técnica ASOH para o polimorfismo $C^{502} \rightarrow T$, e por análise de restrição para a deleção 805delG (figura 24-a). Os resultados quanto a deleção $C^{502} \rightarrow T/\text{del}$ estão na figura 20.

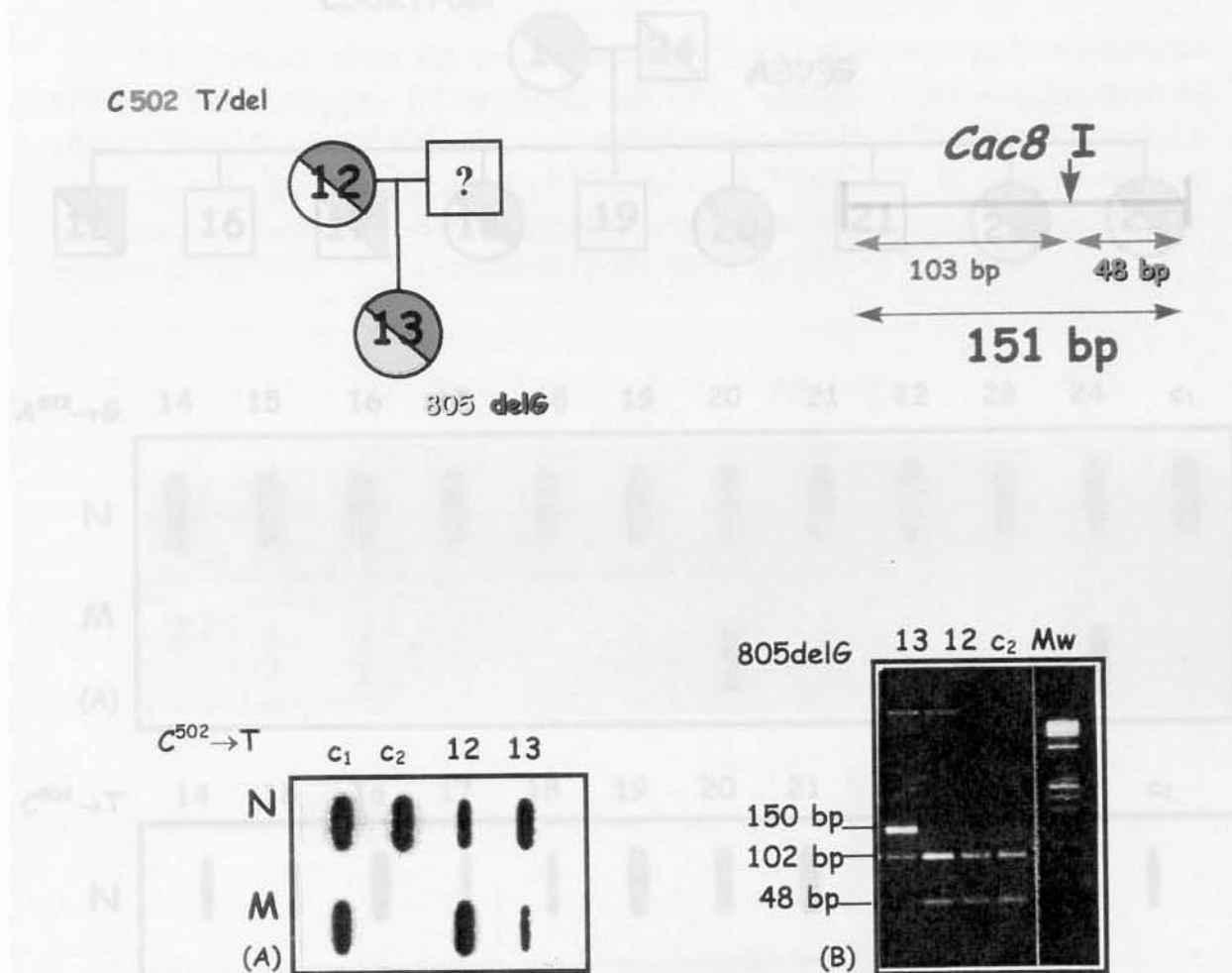


Figura 24 - Resultados das alterações encontradas no gene da GALC para a família 3. (A) ASOH para o polimorfismo $C^{502} \rightarrow T$; (B) Análise de restrição para a deleção 805delG; (C_1) controle positivo; (C_2) controle negativo; (N) normal; (M) mutante; (Mw) marcador de peso molecular.

d) Família 4

Além da mutação $C^{502} \rightarrow T/\text{del}$, foi encontrada a mutação $A^{893} \rightarrow G$ no outro alelo do heterozigoto composto. A análise dessa mutação, em DNA genômico, foi feita pela técnica de ASOH em todos os indivíduos da genealogia. A figura 25 mostra os resultados obtidos. O resultado quanto a deleção $C^{502} \rightarrow T/\text{del}$ está na figura 20.

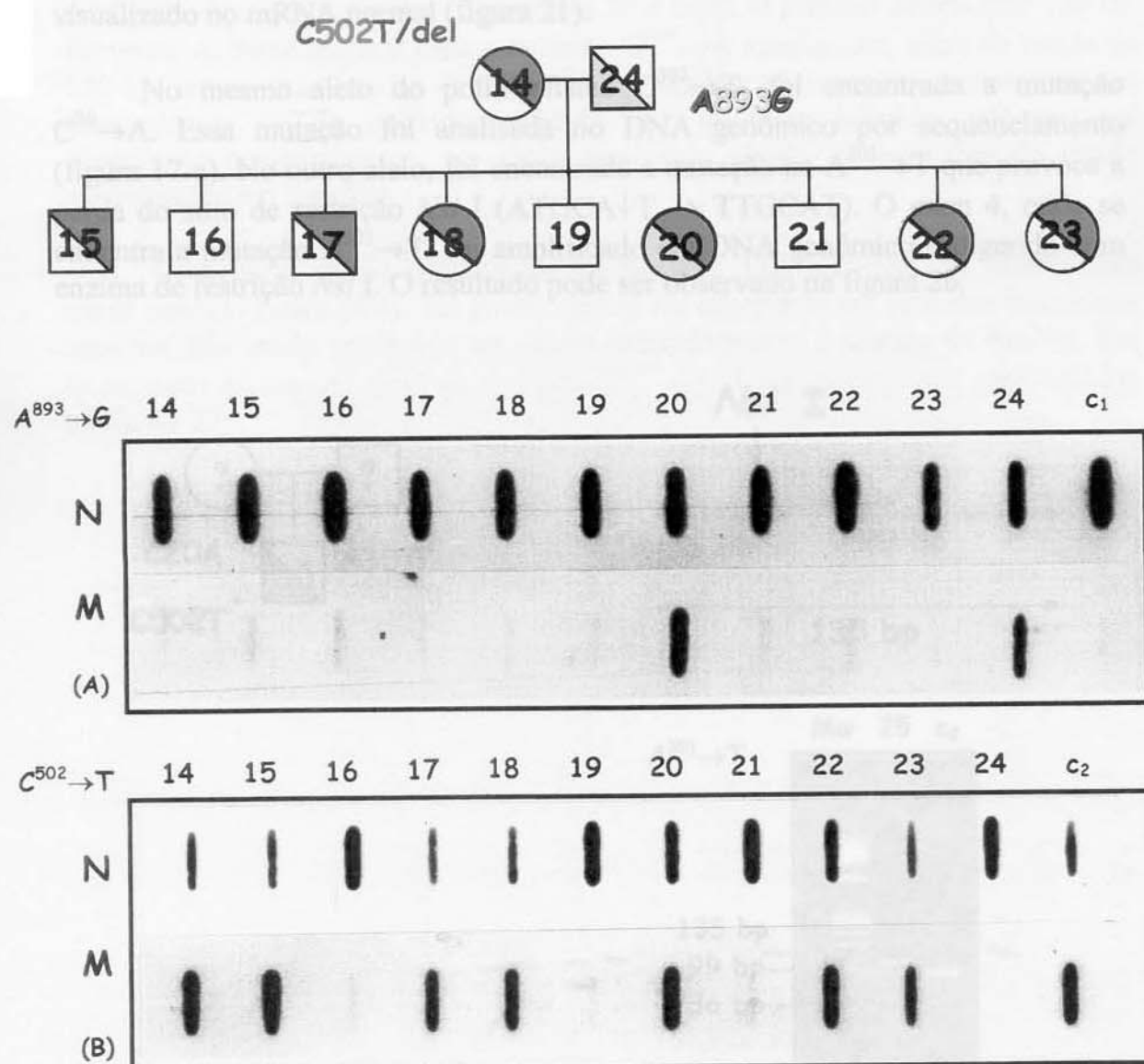


Figura 25 - Resultados das alterações encontradas no gene da **GALC** para a família 4. (A) ASOH para a mutação $A^{893} \rightarrow G$; (B) ASOH para o polimorfismo $C^{502} \rightarrow T$; (c_1) controle positivo; (c_2) controle negativo; (N) normal; (M) mutante.

e) Família 5

Nesse caso, foi estudado apenas o indivíduo afetado pela doença de Krabbe, não sendo possível obter amostras dos demais membros da família. O polimorfismo $C^{502} \rightarrow T$ está presente, mas não associado à deleção após o exon 10. Nesse indivíduo é visível uma redução no mRNA de menor tamanho e uma vez que a deleção não está presente, o polimorfismo $C^{502} \rightarrow T$ também pode ser visualizado no mRNA normal (figura 21).

No mesmo alelo do polimorfismo $C^{502} \rightarrow T$, foi encontrada a mutação $C^{20} \rightarrow A$. Essa mutação foi analisada no DNA genômico por sequenciamento (figura 17-a). No outro alelo, foi encontrada a mutação na $A^{301} \rightarrow T$ que provoca a perda do sítio de restrição *Nsi* I ($ATGCA \downarrow T \rightarrow TTGCAT$). O exon 4, onde se encontra a mutação $A^{301} \rightarrow T$, foi amplificado em DNA genômico e digerido com enzima de restrição *Nsi* I. O resultado pode ser observado na figura 26.

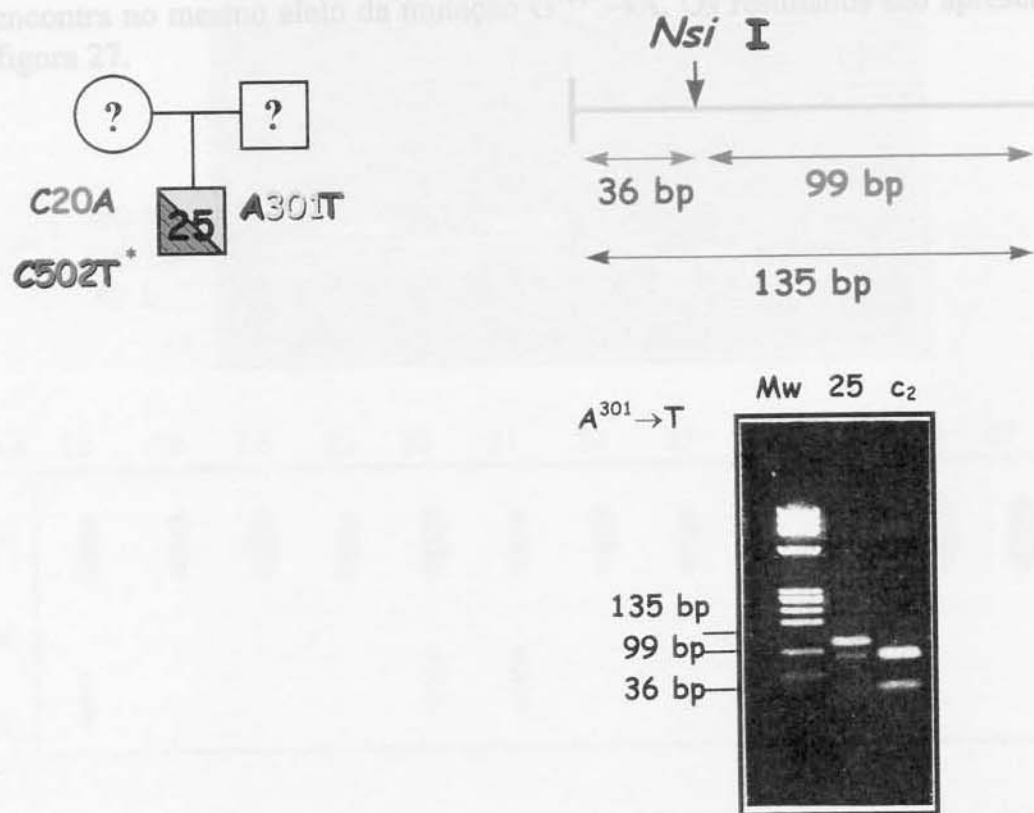


Figura 26 - Análise de restrição para a mutação $A^{301} \rightarrow T$ para o indivíduo 25; (c₂) controle negativo; (Mw) marcador de peso molecular.

f) Família 6

Nos descendentes heterozigotos, do indivíduos afetado pela doença de Krabbe, foi encontrada a mutação $G^{1609} \rightarrow A$, sendo que o DNA genômico foi analisado pela técnica de ASOH. Da mesma forma, foi identificada a mutação $G^{809} \rightarrow A$, estudada em DNA genômico por análise de restrição. Essa mutação determina a perda do sítio de restrição da enzima *Fnu* 4HI ($GC \downarrow TGC \rightarrow ACTGC$). A amplificação de parte do exon 8, incluindo a posição 809, em DNA genômico, foi feita usando-se os *primers* 3F e G8R. O produto obtido é de 150 bp. Portanto, os heterozigotos para a mutação $G^{809} \rightarrow A$ apresentam, além da banda de 150 bp, outras duas bandas de 105 e 45 bp. Ambas as mutações encontradas nos descendentes do do indivíduo afetado que já havia falecido, puderam ser observadas posteriormente, em DNA genômico obtido de inclusões de tecido armazenadas em parafina,.

Uma nova região polimórfica na posição 1873 ($G \rightarrow A$) foi identificada nessa família (figura 24-i). Tal polimorfismo foi observado em 10% dos indivíduos normais, não sendo verificado em outros indivíduos com a doença de Krabbe. Ele se encontra no mesmo alelo da mutação $G^{1609} \rightarrow A$. Os resultados são apresentados na figura 27.

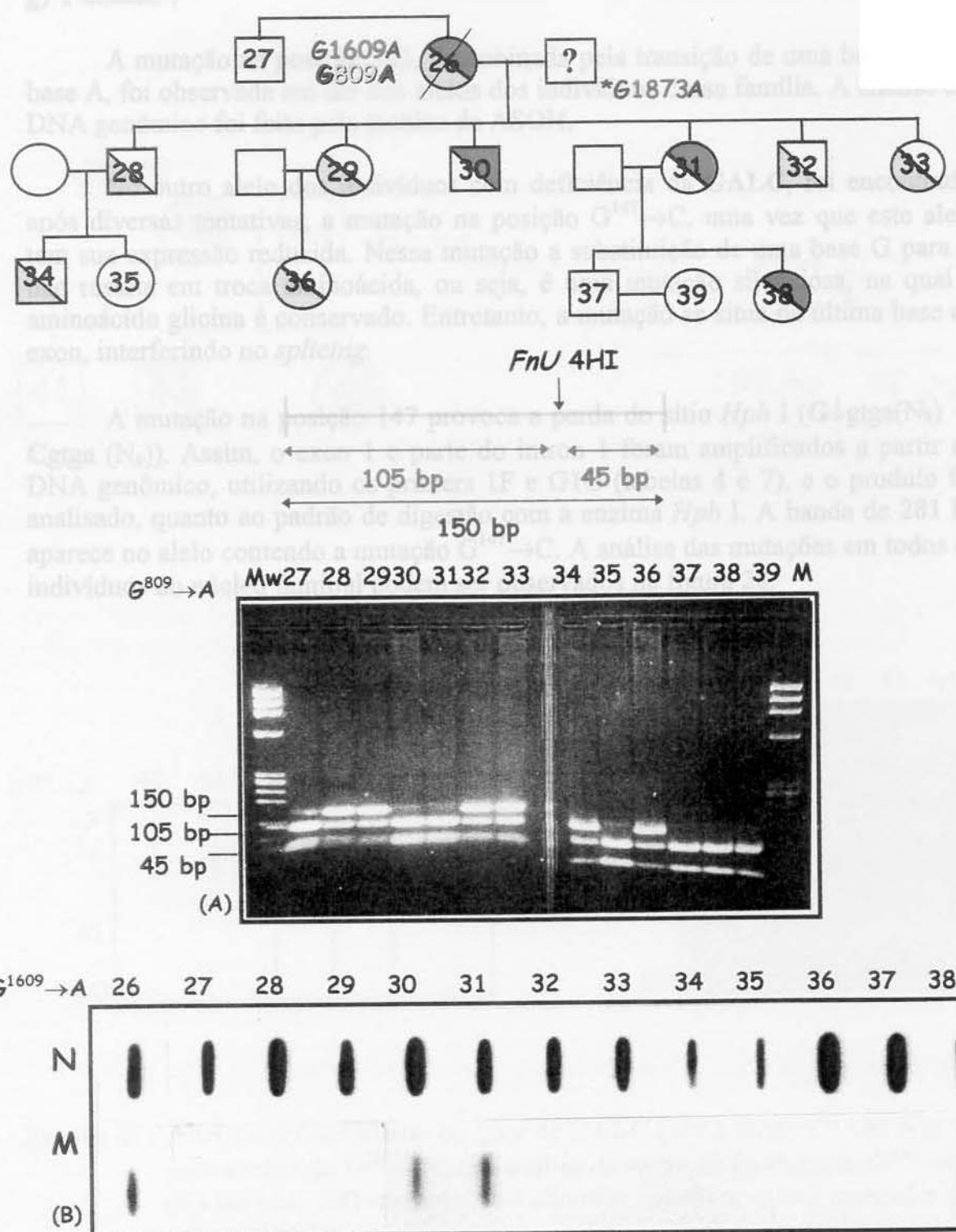


Figura 27 - Resultados das alterações encontradas no gene da **GALC** para a família 6. (A) Análise de restrição para a mutação $G^{809} \rightarrow A$; (B) ASOH para a mutação $G^{1609} \rightarrow A$; (N) normal; (M) mutante; (Mw) marcador de peso molecular.

g) Família 7

A mutação na posição 283, determinada pela transição de uma base G para base A, foi observada em um dos alelos dos indivíduos dessa família. A análise em DNA genômico foi feita pela técnica de ASOH.

No outro alelo dos indivíduos com deficiência da **GALC**, foi encontrada, após diversas tentativas, a mutação na posição $G^{147} \rightarrow C$, uma vez que este alelo tem sua expressão reduzida. Nessa mutação a substituição de uma base G para C não resulta em troca aminoácida, ou seja, é uma mutação silenciosa, na qual o aminoácido glicina é conservado. Entretanto, a mutação se situa na última base do exon, interferindo no *splicing*.

A mutação na posição 147 provoca a perda do sítio *Hph* I ($G \downarrow gtga(N_8) \rightarrow Cgtga(N_8)$). Assim, o exon 1 e parte do intron 1 foram amplificados a partir do DNA genômico, utilizando os primers 1F e G1G (tabelas 4 e 7), e o produto foi analisado, quanto ao padrão de digestão com a enzima *Hph* I. A banda de 281 bp aparece no alelo contendo a mutação $G^{147} \rightarrow C$. A análise das mutações em todos os indivíduos do núcleo familiar podem ser observados na figura 28.

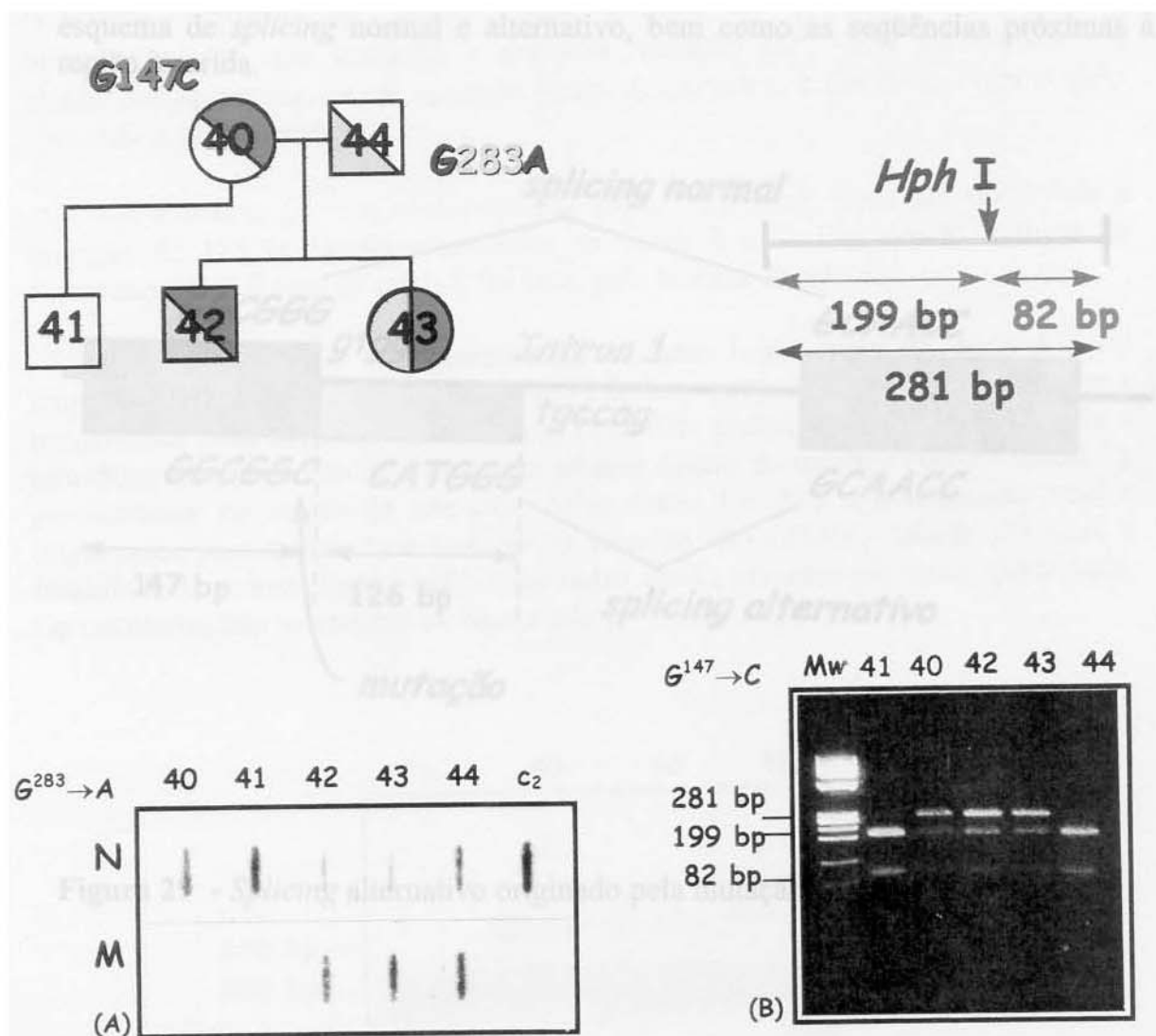


Figura 28 - Alterações encontradas no gene da *GALC* para a família 7. (A) ASOH para a mutação $G^{283} \rightarrow A$; (B) análise de restrição da mutação $G^{147} \rightarrow C$; (N) normal; (M) mutante; (c_2) controle negativo; (Mw) marcador de peso molecular.

A mutação $G^{147} \rightarrow C$ interfere no processo de *splicing* e isso pode ser, de fato, observado pela inserção de 126 bp do intron 1 no mRNA formado. Um outro sítio de *splicing* alternativo dentro do intron 1 é utilizado. A figura 29 mostra o esquema de *splicing* normal e alternativo, bem como as seqüências próximas à região inserida.

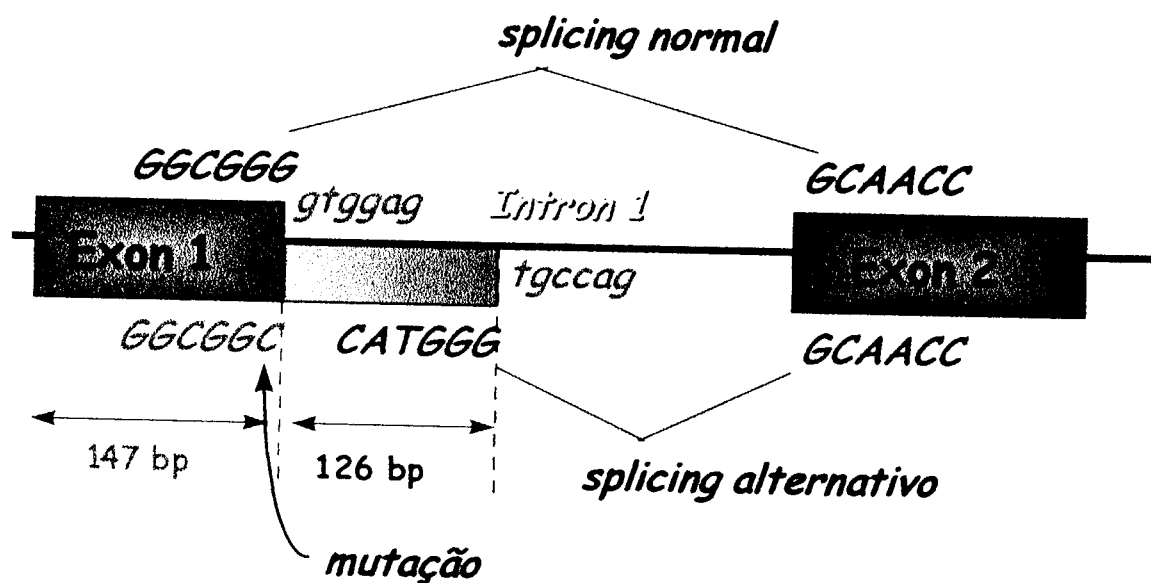


Figura 29 - *Splicing* alternativo originado pela mutação na posição 147.

Contudo, essa nova forma de mRNA, tem expressão reduzida, fato que dificultou bastante, o processo de identificação da mutação $G^{147} \rightarrow$. Foram rastreados centenas de clones, pela técnica de ASOH, utilizando um oligonucleotídeo que continha a primeira mutação ($G^{283} \rightarrow A$) encontrada. Os clones que apresentavam tal mutação foram descartados, a fim de se obter o alelo contendo a outra alteração.

A mutação $G^{147} \rightarrow C$ foi estudada em cDNA, onde pode ser observada a inserção de 126 bp, exatamente entre os exons 1 e 2. Um estudo indireto da expressão dessa forma de mRNA foi feito pela técnica de ASOH.

O fragmento 1, que compreende o exon 1 até parte do exon 5, foi amplificado em cDNA. Os produtos de PCR foram separados em gel de agarose e transferidos para um filtro. Assim, dois tamanhos puderam ser observados após a hibridização, com o uso de uma sonda situada dentro do intron 1 (G1G - tabela 7), precisamente na região de inserção. Além disso, foi feita a hibridização com o oligonucleotídeo contendo a base G na posição 283 (283N - tabela 13), com a finalidade de se visualizar o mRNA do outro alelo, presente em maior quantidade. Os resultados são mostrados na figura 30.

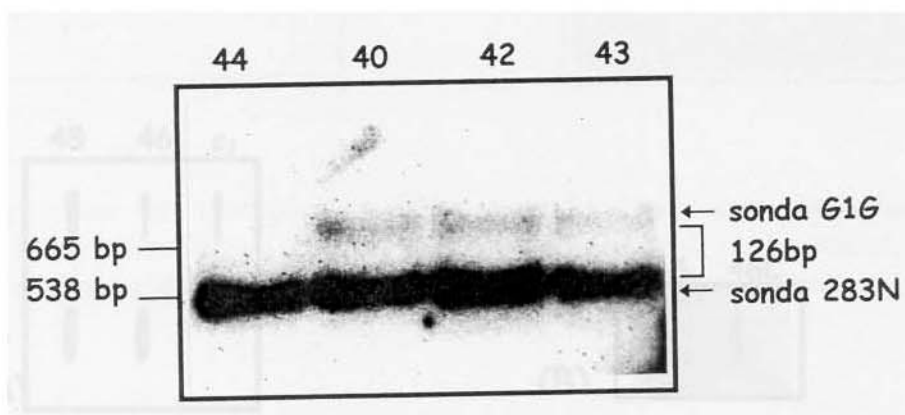


Figura 30 - Estudo da expressão do alelo contendo a mutação $G^{147} \rightarrow C$. Resultado da hibridização do fragmento 1 com as sondas G1G (situada dentro da região de 126 bp no intron 1) e 283N (situado no mRNA do alelo normal).

h) Família 8

Nessa família foram analisados dois indivíduos, onde foi encontrada a mesma mutação da família 7, na posição 283 (G→A). Essa mutação foi analisada em DNA genômico pela técnica de ASOH. No outro alelo, foi detectada uma inserção de 34 bp na posição 573, exatamente entre os exons 6 e 7. Essa alteração é observada no mRNA e provoca uma inserção de 4 aminoácidos seguido de um codon de terminação. A inserção de 34 bp está presente em ambas as formas de mRNA (normal e menor). Os resultados podem ser observados na figura 31.

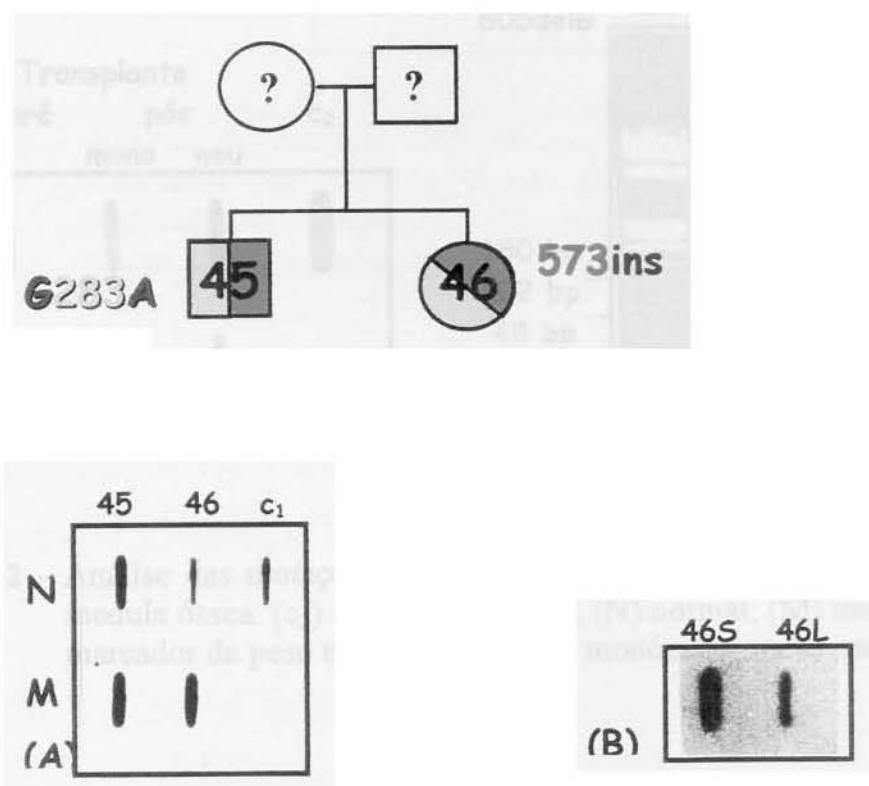


Figura 31 - Alterações encontradas no gene da GALC para a família 8. (A) ASOH para a mutação G²⁸³→A; (B) ASOH em cDNA para a inserção na posição 573; (L) transcrito normal; (S) transcrito menor; (N) normal; (M) mutante.

7 - Indivíduos submetidos a transplante de medula óssea (TMO)

O DNA genômico isolado a partir de neutrófilos e monócitos dos indivíduos 9 e 45 foi analisado, quanto as suas respectivas mutações, antes e após o transplante de medula óssea.

O indivíduo 9 foi estudado quanto a presença da mutação 805delG e da mutação $C^{502} \rightarrow T/\text{del}$. A mutação 805delG não foi identificada, enquanto a mutação $C^{502} \rightarrow T/\text{del}$ estava presente após o transplante, uma vez que o doador era heterozigoto para essa alteração. Os resultados são mostrados na figura 32.

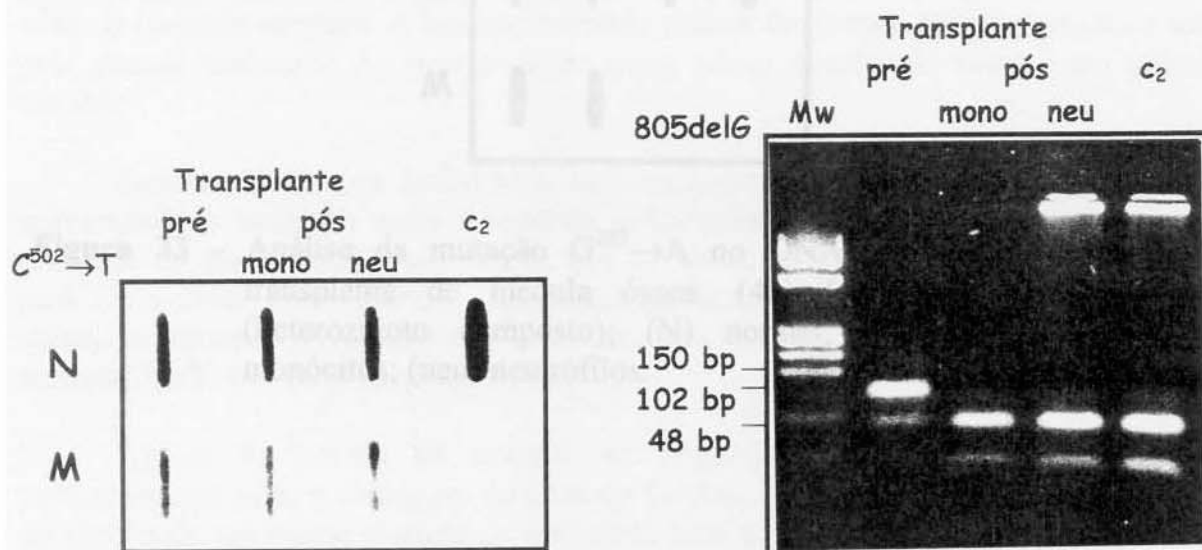


Figura 32 - Análise das mutações no DNA do indivíduo 9 após transplante de medula óssea. (c₂) controle negativo; (N) normal; (M) mutante; (Mw) marcador de peso molecular; (mono) monócitos; (neu) neutrófilos.

O indivíduo 45 foi analisado somente quanto à mutação $G^{283} \rightarrow A$, uma vez que a inserção de 34 bp somente é observada no cDNA. A mutação $G^{283} \rightarrow A$ não foi identificada após o transplante.

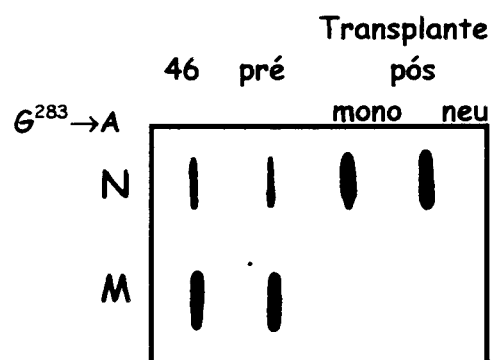


Figura 33 - Análise da mutação $G^{283} \rightarrow A$ no DNA do indivíduo 45 após transplante de medula óssea. (46) Irmão do indivíduo 45 (heterozigoto composto); (N) normal; (M) mutante; (mono) monócitos; (neu) neutrófilos

Discussão

Neste trabalho foram analisados indivíduos com doença de Krabbe, diagnosticados anteriormente por dosagem enzimática. A estratégia ora desenvolvida, utilizando a técnica de PCR longo e a separação dos alelos, permitiu um resultado rápido e conclusivo com relação às mutações presentes no gene, exceto no caso em que a mutação envolveu a alteração de um sítio de *splicing*, onde o alelo que a continha era expresso em nível extremamente baixo, sendo mais demorado o seu isolamento.

A forma tardia da doença de Krabbe costuma estar associada à manifestações clínicas bastante atípicas. A heterogeneidade clínica da doença poderia ser explicada pela grande variedade de alterações no gene, como constatado neste e em outros estudos.

Embora 50% dos indivíduos heterozigotos compostos estudados tenham apresentado a mutação mais freqüente, principalmente aqueles com ascendentes oriundos no norte da Europa, parece que as mutações encontradas são específicas para cada caso, concordando com dados publicados previamente. Somente duas mutações foram encontradas em mais de uma família, e apenas um genótipo é compartilhado por duas famílias diferentes.

Apesar do estudo da doença ter progredido muito nos últimos anos, principalmente após a clonagem do gene da **GALC**, por meio da análise molecular e do estudo de um maior número de pacientes com a forma tardia, os quais puderam ser diagnosticados com maior precisão, ainda assim é difícil estabelecer a correlação genótipo/fenótipo, mesmo porque a proteína ainda não se encontra devidamente caracterizada.

Alterações encontradas no gene

A alteração mais frequentemente observada nos indivíduos com deficiência da atividade da **GALC** estudados foi a deleção após o exon 10, a qual está associada ao alelo contendo o polimorfismo $C^{502} \rightarrow T$. Esse alelo $C^{502} \rightarrow T/\text{del}$, é reconhecido como o mais freqüente nos pacientes com a doença de Krabbe e oriundos do norte da Europa. E, na amostra analisada, 50% das famílias possuem $C^{502} \rightarrow T/\text{del}$, sendo que somente uma família tem origem étnica na Índia. Na tabela 16 podem ser observadas as mutações discutidas, bem como a origem étnica e evolução dos pacientes.

Tabela 14 - Resumo das alterações encontradas.

Família (origem étnica)	Paciente	Idade início	Idade atual	Mutação alelo1/alelo 2	Polimorfismos alelo1/alelo2
1 (Indiano)	2 (F) 3 (M)	6 anos 4 anos	25 anos falecido (16 anos)	643G→A 502T/del	502C/1637C/1873G 502T
2 (Irlandês, Alemão Italiano)	8 (F) 9 (M) 10(M)	4 anos A 4 anos	14 anos 11 anos (TMO) 10 anos	805delG 502T/del	502C/1637C/1873G 502T
3-(Irlandês, Inglês, Nativo Norte Americano)	13 (F)	13 anos	25 anos	805delG 502T/del	502C/1637C/1873G 502T
4 (Irlandês, Inglês, Francês, Nativo Norte Americano)	20 (F)	5 meses	falecido (3 anos)	893A→G 502T/del	502C /1637C/1873G 502T
5 (Polonês)	(25)M	13 anos	35 anos	20C→A 301A→T	502T /1637C/1873G 502C/1637C/1873G
6- (Italiano)	(26)F	infância	falecido (73 anos)	809G→A 1609G→A	502C/1637C/1873G 502C/1637C/1873A
7 (Afro- Americano)	42 (M) 43 (F)	16 anos A	17 anos 16 anos	147G→C 283G→A	502C/1637C/1873G 502C/1637T/1873G
8 (Inglês, Alemão, Norueguês)	45 (M) 46 (M)	A 1 ano	4 anos (TMO) falecido (27 meses)	283G→A 573ins(34)	502C/1637C/1873G 502C/1637C/1873G

(M)-masculino; (F)-feminino; (A) assintomático; (TMO) - transplante de medula óssea.

Foram consideradas mutações com efeito deletério nesse trabalho, aquelas identificadas em indivíduos com manifestação fenotípica da doença de Krabbe e que não correspondiam a polimorfismos moleculares comuns. Cada uma das novas mutações encontradas foram pesquisadas em indivíduos normais, não portadores da doença de Krabbe. Além disso, as mutações aqui apresentadas foram as únicas detectadas em toda a região codificante, em seus respectivos alelos.

É interessante notar que a maioria das mutações identificadas pelo presente estudo, estão situadas nos exons responsáveis pela produção da subunidade de 50 kDa da enzima (exons 1-12 e parte do exon 13), a qual parece crítica para a atividade catalítica da **GALC** (Sakai *et al.*, 1994; Luzi *et al.*, 1995). Entretanto, pesquisas recentes apontam mutações nos exons 4, 5, 14, 15 e 16 como as principais causas da doença (Luzi *et al.*, 1996).

As mutações $G^{283} \rightarrow A$ e 805delG foram detectadas em mais de uma família, assim como o genótipo $C^{502} \rightarrow T/\text{del}$ e 805delG é o mesmo para as famílias 2 e 3. Nenhuma relação foi estabelecida entre esses resultados obtidos e essas famílias.

A deleção encontrada na posição 805delG provoca uma mudança no quadro de leitura do gene e um códon prematuro de terminação na posição 827, o que supostamente, deve resultar em prejuízo na atividade da **GALC**.

Com relação à mutação sem sentido encontrada na posição $C^{20} \rightarrow A$, também foram previamente observadas outras duas mutações com substituição aminoácida nessa região ($G^{13} \rightarrow C$ e $C^{27} \rightarrow A$), situadas na sequência *leader* do gene, mas que não foram consideradas como a causa da doença. Entretanto, a mutação $C^{20} \rightarrow A$, insere um códon prematuro de terminação e está presente no mesmo alelo contendo o polimorfismo $C^{502} \rightarrow T$, resultando na ausência da atividade enzimática da **GALC**.

Algumas mutações encontradas neste trabalho foram, posteriormente, analisadas com relação à sua expressão por De Gasperi e colaboradores (1996). A expressão do cDNA da **GALC** foi feita pela técnica de co-precipitação com fosfato de cálcio. Construções do cDNA de sequência normal (contendo o polimorfismo $T^{1637} \rightarrow C$) e de sequências mutantes, no vetor pcDNA3, foram transfectadas em células COS-7, juntamente com o plasmídeo pBLCAT2, contendo o gene repórter que codifica a cloranfenicol acetil-transferase (CAT) como controle.

Nessas construções, além da mutação, foram consideradas as regiões polimórficas das posições 502 e 1637, sendo reproduzido o alelo do indivíduo em questão. É importante ressaltar, que a atividade da **GALC**, com relação ao polimorfismo 1637C, é a metade da obtida quando a situação é 1637T. Essa hipótese foi elaborada por Wenger e Chen, em 1993, quando tais autores consideraram a possibilidade de existirem dois alelos que determinavam atividades intrinsecamente diferentes da **GALC**, tendo uma cerca da metade da atividade da outra. Tais suposições, foram comprovadas em estudos subsequentes (Luzi *et al.*, 1995; De Gasperi *et al.*, 1996).

Foram analisadas com relação à expressão por De Gasperi e colaboradores (1996), a mutação sem sentido $C^{20} \rightarrow T$ e as mutações pontuais com substituição aminoácida $G^{283} \rightarrow A$, $A^{301} \rightarrow T$ e $A^{893} \rightarrow G$. E, não foi observada qualquer atividade residual da **GALC** nas seguintes construções (associadas ou não aos diferentes alelos polimórficos): $C^{20} \rightarrow T + C^{502} \rightarrow T$, $G^{283} \rightarrow A + C^{1637} \rightarrow T$, $G^{283} \rightarrow A + T^{1637} \rightarrow C$ e $A^{893} \rightarrow G + T^{1637} \rightarrow C$.

A atividade *in vitro* da **GALC**, correspondente ao alelo contendo $A^{301} \rightarrow T + T^{1637} \rightarrow C$, é de 20%, enquanto o alelo $G^{643} \rightarrow A + T^{1637} \rightarrow C$ apresentou uma atividade de 70-85%, com relação ao cDNA contendo somente o polimorfismo $T^{1637} \rightarrow C$. A tabela 15 resume essas análises.

Tabela 15- Expressão do gene da **GALC** contendo diferentes mutações

Mutação	Atividade relativa da GALC
$C^{20} \rightarrow T + C^{502} \rightarrow T$	nenhuma
$G^{283} \rightarrow A + C^{1637} \rightarrow T$	nenhuma
$G^{283} \rightarrow A + T^{1637} \rightarrow C$	nenhuma
$A^{893} \rightarrow G + T^{1637} \rightarrow C$	nenhuma
$A^{301} \rightarrow T + T^{1637} \rightarrow C$	20%
$G^{643} \rightarrow A + T^{1637} \rightarrow C$	70-85%

(De Gasperi *et al.*, 1996).

Apesar de as mutações $A^{301} \rightarrow T$ e $G^{643} \rightarrow A$ não terem sido encontradas em indivíduos não portadores da doença de Krabbe, ainda não está completamente afastada a hipótese de representarem um polimorfismo raro, uma vez que, quando analisadas *in vitro* demonstraram alguma atividade da **GALC**. Nenhuma outra alteração foi encontrada na região codificante dos alelos contendo essas mutações, mas não se pode descartar a possibilidade da ocorrência de uma mutação adicional, fora da região codificante, por exemplo em regiões regulatórias do gene, o que poderia afetar a eficiência e (ou) a estabilidade do mRNA formado.

A mutação silenciosa na posição $G^{147} \rightarrow C$, não provoca substituição aminoácida, mas determina a alteração na última base do exon 1 interferindo no sítio *splicing*. Dessa forma, um sítio alternativo de *splicing* é utilizado à 126 bp dentro do íntron 1. O resultado é a inserção de 126 bp cujo efeito na atividade da **GALC** é desconhecido. Contudo, a estabilidade do mRNA formado, parece ser drasticamente reduzida, devido à baixa expressão desse alelo, como pode ser observado na figura 30.

A inserção de 34 bp na posição 573G, determina um codón de terminação prematuro a 12 bp dentro da sequência inserida. A origem dessa inserção ainda não foi estudada, mas ela pode ser resultado da retenção de parte do íntron 6, alguma alteração nessa região, produzindo sítios de *splicing* alternativos e inserindo um “novo” exon na sequência. Mutações em sequências intrônicas podem criar novos sítios de *splicing* sem alterar os autênticos (Nakai & Sakamoto, 1994). A sequência de 34 bp inserida não apresenta qualquer homologia significativa em relação aos bancos de análise de sequências disponíveis. O estudo minucioso do íntron 6, poderá levar a identificação precisa da região envolvida.

A expressão *in vitro* das mutações presentes no genótipo da família 6 ainda não foi estudada. As alterações encontradas ($A^{809} \rightarrow G$, $G^{1609} \rightarrow A$ e $G^{1873} \rightarrow A$) foram as únicas dentro da região codificante. A substituição $G^{1873} \rightarrow A$ entretanto, foi observada em 10% dos indivíduos normais analisados, sendo considerada um novo polimorfismo no gene. É possível que alguma atividade residual da **GALC** esteja presente apesar das mutações, o que poderia explicar o fenótipo incomum do indivíduo 26, que corresponde ao único caso descrito de um indivíduo com doença de Krabbe com uma sobrevida tão longa (óbito aos 73 anos). Nessa família, as mutações encontradas em ambos os alelos foram, por sua vez, detectadas nos heterozigotos descendentes do indivíduo 26, já que este havia falecido na ocasião do estudo. Posteriormente, as mutações foram confirmadas no indivíduo afetado pelo DNA obtido nas inclusões de tecido preservado em parafina.

Com relação aos quadros de manifestação tardia da doença, talvez uma atividade residual da **GALC** pudesse justificar essa situação, como no caso das famílias 1, 5 e 6.

Nos indivíduos portadores da mutação que altera o sítio de *splicing* no exon 1, $G^{147} \rightarrow C$, é possível haver alguma atividade da enzima, derivada da presença de baixo nível de mRNA normal. Outros casos foram observados, onde a despeito da mutação na região 5' doadora, foi possível a utilização do sítio original de *splicing* (Vidaud *et al.*, 1989; Akli *et al.*, 1990). Isso poderia explicar, portanto, o caso assintomático da família 7 (indivíduo 43).

O fenótipo do indivíduo da família 4 (forma infantil clássica) concorda com os resultados encontrados, compatíveis com a ausência da atividade da **GALC** em ambos os alelos. Contudo, fica muito difícil de se entender o fenótipo das famílias 2 e 3, nas quais não se observa nenhuma atividade da **GALC** nas expressões *in vitro*, em ambos os alelos mutantes, não podendo, portanto, ser explicada a manifestação tardia da doença em 3 indivíduos das famílias 2 e 3 e no indivíduo assintomático da família 2. A possibilidade de que outros fatores possam ser responsáveis pelos fenótipos observados não pode ser excluída.

Os polimorfismos

A presença de polimorfismos no gene da **GALC** pode resultar na alteração da atividade dessa enzima, explicando os chamados pseudodeficientes, que são indivíduos com reduzida atividade enzimática encontrados na população normal. É o caso da relação que existe entre as atividades dos alelos 1637C ou T. Wenger e Chen (1993), já haviam observado a diferença entre esses alelos. Esse polimorfismo parece ser a principal causa dos problemas associados à identificação de heterozigotos em famílias com indivíduos afetados pela doença de Krabbe.

Uma única mutação em um gene nem sempre será danosa para a atividade da proteína envolvida. Entretanto, a soma de duas ou mais mutações no mesmo alelo que quando isoladas são consideradas polimorfismos moleculares, podem provocar efeitos imprevisíveis na expressão do gene e (ou) na atividade da proteína (Luzi *et al.*, 1995).

O polimorfismo $C^{502} \rightarrow T$, que está sempre presente tanto no alelo contendo a deleção a partir do exon 10, quanto no alelo sem a deleção mas associado ao polimorfismo 1637C, resulta em uma drástica redução na atividade da **GALC** (Luzi *et al.*, 1995b).

É curioso que a maioria das mutações encontradas neste trabalho, se situem no alelo 1637C, onde a atividade da **GALC** é reduzida com relação ao alelo 1637T. As proporções observadas, por De Gasperi e colaboradores (1996), desses alelos em 33 famílias normais escolhidas ao acaso foram: de 24% nos homozigotos para o alelo 1637C, 46% nos portadores de ambos os alelos 1637C e T e de 30% nos homozigotos para o alelo 1637T. Nos indivíduos com deficiência na atividade da **GALC** aqui analisados, 85% são homozigotos para o alelo 1637C, e 15% heterozigotos para 1637C e T.

Uma vez que a maioria das mutações encontradas estão relacionadas ao alelo 1637C, a análise desse polimorfismo poderá servir como um método de triagem na pesquisa de mutações em indivíduos com a doença de Krabbe, já que, o efeito de uma substituição aminoácida poderá ser influenciado pela presença de outra mutação (Hara *et al.*, 1994).

O polimorfismo $C^{502} \rightarrow T$ foi encontrado em 50% das famílias estudadas, sendo que, todos os indivíduos com a deficiência na atividade da **GALC** foram heterozigotos para o alelo 502T. Pela técnica de PCR desenvolvida por Luzi e colaboradores (1995a), esses indivíduos foram estudados com relação à deleção a partir do exon 10. Entre aqueles com o polimorfismo $C^{502} \rightarrow T$, 7 indivíduos (famílias 1 $\rightarrow$ 4) possuíam também a deleção após o exon 10 e apenas um (família 5), possuía somente o polimorfismo não associado à deleção.

Foram analisados também, o nível de transcrição do mRNA de menor tamanho, com relação ao polimorfismo $C^{502} \rightarrow T$. O transcrito menor é derivado do uso de um sítio de poliadenilação alternativo no intron 10, e está presente em baixos níveis nos tecidos (Sakai *et al.*, 1994). Segundo os resultados da figura 21, o transcrito menor de 1,2 kb é o único produto dos alelos contendo a mutação $C^{502} \rightarrow T/\text{del}$, uma vez que o mRNA completo não pode existir devido à deleção.

No caso do indivíduo 25 (família 5), onde o polimorfismo $C^{502} \rightarrow T$ não se apresenta associado à deleção, o transcrito de menor tamanho é expresso em menor nível com relação mRNA normal. O polimorfismo $C^{502} \rightarrow T$ não deve induzir à produção do transcrito menor, mas é possível que alguma região na parte deletada (que inclui introns) possa controlar a sua transcrição, uma vez que ele se expressa em grande quantidade nos alelos contendo a deleção. Tais suposições, entretanto, seriam prematuras sem estudos complementares.

O polimorfismo $G^{1873} \rightarrow A$ ainda não foi estudado, com relação a sua expressão *in vitro*. Até agora esse polimorfismo foi descrito apenas na família 6, não havendo relato de sua identificação em outros pacientes com doença de Krabbe. É possível até que o efeito desse polimorfismo seja positivo com relação a atividade da enzima, tendo em vista o fenótipo do indivíduo envolvido (26).

Indivíduos submetidos a transplante de medula óssea

Um estudo importante a respeito de transplante de medula óssea em doenças de depósito foi, recentemente, publicado por Shapiro e colaboradores (1995). Esses autores apresentam os resultados obtidos em várias condições incluindo a doença de Krabbe. Entre os casos submetidos a transplante que não tiveram complicações intrínsecas a esse procedimento, e não apresentavam a forma clássica infantil da doença, os resultados se mostraram satisfatórios.

Os indivíduos 9 e 45 do presente estudo, foram submetidos a transplante de medula óssea. O DNA genômico isolado a partir de monócitos e neutrófilos foi analisado após o transplante, quanto à presença das mutações que haviam sido previamente encontradas em ambos os alelos.

No caso do indivíduo 45, a mutação $G^{283} \rightarrow A$ não foi detectada após o transplante e a inserção não foi analisada, uma vez que, só é observada em cDNA. No indivíduo 9, a mutação 805delG estava ausente após o transplante, mas o alelo contendo a mutação $C^{502} \rightarrow T/\text{del}$ foi observado. Isso ocorreu porque o seu doador foi uma irmã heterozigota para a mutação $C^{502} \rightarrow T/\text{del}$.

Ambos os indivíduos submetidos a transplante eram assintomáticos e, somente com o tempo poderá se saber sobre a eficácia do tratamento. Contudo, o seguimento das mutações representa uma importante ferramenta na avaliação do sucesso do transplante, bem como no estabelecimento do prognóstico do paciente, a partir de sua realização.

Conclusão

No início deste estudo, somente algumas mutações tinham sido descritas, a estrutura do gene ainda não havia sido estabelecida em detalhes, e não era conhecida a localização correta dos introns na sequência de cDNA do gene da **GALC**. Embora a sequência codificante desse gene não seja muito longa, a grande quantidade de exons dificultou a análise das mutações no DNA genômico nessa ocasião. Apesar disso, a estratégia aqui desenvolvida se mostrou eficiente, mesmo para a detecção das mutações nos indivíduos heterozigotos.

Foram identificadas 11 alterações no gene da **GALC**, diferentes das 23 já descritas até o momento. Com todas as dificuldades encontradas foram detectadas mutações em todas as famílias estudadas, permitindo um diagnóstico de forma definitiva. Um novo polimorfismo foi encontrado. A análise dos polimorfismos e o rastreamento de mutações, criam novas perspectivas para estudos populacionais.

A mutação $C^{502} \rightarrow T/\text{del}$ é a mais comum em indivíduos oriundos no norte da Europa e foi observada em 50% das famílias estudadas. Contudo, ainda parece prematuro tecer comentários a respeito de que alguma região específica seja mais propensa à alterações.

As informações obtidas neste estudo foram importantes para o aconselhamento genético das famílias afetadas, revelando o genótipo dos todos os indivíduos analisados, facilitando a diferenciação dos heterozigotos e o diagnóstico pré-natal, caso necessário.

A possibilidade de uma rápida detecção das alterações descritas, faz da metodologia utilizada, um eficiente instrumento de investigação diagnóstica, proporcionando um método prático de análise de outros indivíduos, ou mesmo o seguimento daqueles submetidos ao transplante de medula óssea, como avaliação do sucesso do transplante.

Resumo

A leucodistrofia por células globóide ou, como é mais conhecida, doença de Krabbe, é uma afecção rara, com padrão de herança autossômico recessivo, cuja alteração básica consiste na deficiência da galactosilceramidase (**GALC**), enzima que catalisa o primeiro passo da degradação do galactosilceramídeo em ceramídeo e galactose. Essa anormalidade bioquímica determina uma doença neurológica com progressiva esclerose no cérebro e o diagnóstico histopatológico é feito baseado na detecção de células globóides multinucleadas na substância branca, as quais podem ser explicadas como uma reação do macrófago ao galactosilceramídeo não degradado. O substrato acumulado, contudo, não é o galactosilceramídeo mas a psicossina, um metabólito tóxico, que também é substrato da **GALC**. A psicossina gerada nos oligodendróglis durante a mielinização atinge um níveis citotóxicos, explicando a perda de mielina no sistema nervoso central e periférico.

A clonagem do gene humano da **GALC**, localizado na parte distal do braço longo do cromossomo 14, foi descrita por dois diferentes grupos em 1993. O cDNA contém 3780 bp, com uma cadeia aberta de leitura 2007 bp, que codificam 669 aminoácidos. Desde sua clonagem, 23 diferentes alterações foram descritas no gene. A deleção dos exons 11 a 17, que começa no meio do intron 10, parece ser muito comum em pacientes oriundos do norte da Europa e com a forma infantil da doença e sempre aparece em associação ao polimorfismo $C^{502} \rightarrow T$.

No presente estudo, analisamos o gene da **GALC** em 46 indivíduos, provenientes de 8 famílias diferentes. Treze desses apresentavam deficiência na atividade da **GALC**, sendo que três são clinicamente assintomáticos. A maioria dos indivíduos afetados, manifestava a forma tardia da doença de Krabbe.

Foram identificadas 11 novas diferentes alterações no gene, incluindo mutações de ponto, uma deleção, uma inserção, e também um novo polimorfismo, além dos dois previamente descritos. Os polimorfismos têm importante um efeito na atividade da **GALC**, explicando o problema na identificação dos heterozigotos com pseudodeficiência na atividade enzimática. O alteração $C^{502} \rightarrow T$ associada à deleção foi encontrada em 50% das famílias estudadas.

Dois indivíduos estudados foram tratados, com sucesso, por transplante de medula óssea. Em tais casos, fomos capazes de corroborar os dados bioquímicos, indicativos de uma restauração na atividade enzimática, demonstrando a ausência das mutações no DNA genômico isolado de monócitos e neutrófilos obtidos após o transplante.

Considerando-se a heterogeneidade clínica da doença, ainda é difícil estabelecer o efeito exato das mutações na estabilidade da **GALC**. A análise molecular certamente facilitará a compreensão da correlação fenótipo/genótipo, mas maiores esclarecimentos nesse sentido estão na dependência da aplicação sistemática dessa metodologia, associada à análise clínica, de um maior número de indivíduos afetados pela doença de Krabbe e seus familiares.

Abstract

Globoid cell leukodystrophy (**GLD**) or Krabbe disease, as it is better known, is a rare autosomal recessive disorder, resulting from the deficiency of galactosylceramidase (**GALC**), the enzyme that catalyzes the first step of galactosylceramide degradation to ceramide and galactose. This biochemical abnormality determines a neurological disease with progressive brain sclerosis. The histopathological diagnosis is made based on the presence of multinucleated globoid cells in the white matter. These cells can be explained as a macrophage reaction to undegraded galactosylceramide. However, the accumulated substrate is not galactosylceramide but psychosine, a toxic metabolite, that is also a substrate for **GALC**. The psychosine generated within oligodendroglia during myelination reaches a toxic level, explaining the loss of myelin in the central and peripheral nervous system.

The cloning of the human **GALC** gene, located at the distal tip of the chromosome 14 long arm, was reported by two different groups in 1993. The cDNA contains 3780 bp, with an open reading frame of 2007 bp, which encodes 669 aminoacids. Since its cloning, 23 different alterations have been reported in this gene. A deletion of exons 11 to 17, that begins in the middle of intron 10, appears to be very common in patients with a Northern European origin and with the infantile form of **GLD**. This deletion is always in association with the polymorphism C⁵⁰²→T.

In the present study we have analyzed the **GALC** gene in 46 individuals, from 8 families. Thirteen individuals were previously diagnosed with a deficient **GALC** activity, three of them are clinically asymptomatic. The majority manifested the late-onset variant form of Krabbe disease.

We have identified 11 new different alterations in the gene, including point mutations, one deletion, one insertion and also a new polymorphism, besides the two ones previously published. These polymorphisms clearly have an effect on the **GALC** activity, explaining the problem with heterozygous identification. The polymorphism C⁵⁰²→T associated with the deletion was found in 50% of the families studied.

Two individuals studied have been successfully treated by bone marrow transplantation. In those cases, we were able to substantiate the biochemical data, which indicated the restoration of enzyme activity, by showing the absence of the mutations in the genomic DNA isolated from monocytes and neutrophils obtained after the transplant.

Considering the clinical heterogeneity of this disease, it is still hard to establish the exact effects of these point mutations on the stability of **GALC**. The molecular analysis certainly will make it easier to understand the correlation phenotype/genotype, but further information about this will depend on a systematic application of this methodology, combined with clinical evaluation, in a greater number of individuals with Krabbe disease and their relatives.

Bibliografia

- AKLI, S.; CHELLY, J.; MEZARD, C.; GANDY, S.; KAHN, A.; POENARU, A.
A "G" to "A" mutation at position -1 of a 5' splice site in a late infantile form of Tay-Sacks disease. *J Biol Chem* **265**: 7324, 1990.
- ALTSCHUL, F. S.; GISH, W.; MILLER, W.; MEYERS, E. W.; LIPMAN, D.
Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**: 403, 1990.
- ARVIDSSON, J.; HAGBERG, B.; MANSSON, J. E.; SVENNERHOLM, L. Late onset globoid cell leukodystrophy (Krabbe's disease). Swedish case with 15 years of follow-up. *Acta Paediatrica*. **84(2)**: 218, 1995.
- AUSTIN, J. H. Studies in globoid (Krabbe) leukodystrophy. II. Controlled thin-layer chromatographic studies of globoid body fractions in seven patients. *J Neurochem* **10**: 921, 1963.
- AUSTIN, J. H.; ARMSTRONG, D.; SHEARER, L. Metachromatic form of diffuse cerebral sclerosis V. The nature and significance of low sulfatase activity: A controlled study of brain, liver and kidney in four patients with metachromatic leucodystrophy (MLD). *Arch Neurol* **13**: 593, 1965.
- BERNARDI, B.; FONDA, C.; FRANZONI, E. MARCHIANI, V.; DELLA GUISTINA, E.; ZIMMERMAN, R. A. MRI and CT in Krabbe's disease: case report. *Neuroradiology*. **36(6)**: 477- 9 , 1994.
- BLACKWOOD, W.; CUMINGS, J. N.; A histochemical and chemical study of three cases of diffuse cerebral sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **17**: 33, 1954.
- CANNIZZARO, L. A.; CHEN, Y. Q.; RAFI, M. A.; WENGER, D. A. Regional mapping of the human galactocerebrosidase gene (GALC) to 14q31 by *in situ* hybridization. *Cytogenet Cell Genet* **66**: 244, 1994.

- CHEN, Y. Q. ; WENGER, D. A. Galactocerebrosidase from human urine: purification and partial characterization. *Biochim Biophys Acta* **1170**:53, 1993.
- CHEN, Y. Q.; RAFI, A. M.; de GALA, G.; WENGER, D. A. Cloning and expression of cDNA encoding human galactocerebrosidase, the enzyme deficient in globoid cell leukodystrophy. *Human Molec Genetics* **2**: 1841, 1993.
- CLELAND, W. W.; KENNEDY, E. P. The enzymatic synthesis of phychosine. *J Biol Chem* **235**: 45, 1960.
- COOLIER, J.; GREENFIELD, J. G. The encephalitis periaxialis of Schilder: a clinical and pathological study with an account of two cases, one of which was diagnosed during life. *Brain* **47**: 489, 1924.
- D'AGOSTINO, A. M.; SAYRE, G. P.; HAGLES, A. B. Krabbe's disease. *Arch Neurol* **8**: 82, 1963.
- DE GASPERI, R.; GAMA SOSA, M. A.; SARTORATO, E. L.; BATTISTINI, S.; MACFARLANE, H.; GUSELLA, J. F.; KRIVIT, W.; KOLODNY, E. H. Molecular heterogeneity of late-onset forms of globoid-cell leukodystrophy. *Am J Hum Genet*, in press, 1996.
- DUNN, H. G.; DOLMAN, C. L.; FARELL, D. F.; TISCHER, B.; HASINOFF, C.; WOOLF, L. I. Krabbe's leukodystrophy without globoid cells. *Neurology* **26**: 1035, 1976.
- ERLICH, J.; GELFAND, D. H.; SAIKI, R. K. Specific DNA amplification. *Nature* **331**: 461-462, 1988.
- FIUMARA, A.; PAVONE, L.; SICILIANO, L.; TINE, A.; PARANO, E.; INNICO, G. Late-onset globoid cell leukodystrophy. report on seven new patients. *Childs Nerv Syst* **6**: 194, 1990.

- FRANKHAUSER, R.; LUGINBUHL, H.; HARTLEY, W. J. Leukodistrophie vom Typus Krabbe beim *Hund Arch Tierheilk* **105**: 198, 1963.
- GAMA SOSA, M. A.; DE GASPERI, R.; UNDEVIA, S.; YERETSIAN, J.; ROUSE II, C. S.; LYERLA, T. A.; KOLODNY, E. H. Correction of the galactocerebrosidase deficiency in globoid cell leukodystrophy-cultured by SL3-3 retroviral-mediated gene transfer. *Biochem Biophys Res Commun* **218**: 766, 1996.
- GREENFIELD, J. A form of progressive cerebral sclerosis in infants associated with primary degeneration of the interfascicular glie. *J Neurol Psycopath* **13**: 289, 1933.
- GREWAL, R. P.; PETRONAS, N.; BARTON, N. W. Late-onset globoid cell leukodystrophy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **54**: 1011, 1991.
- GUTMANN, L.; HOGAN, G.; CHOU, S. M.; The peripheral neuropathy of Krabbe's (globoid) leucodystrophy. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* **27**: 715, 1969.
- GUZZETTA, F.; RODRIGUEZ, J.; DEODATO, M.; GUZZETTA, A. FERRIERE, G. Demyelinating hereditary neuropathies in children: a morphometric and ultrastructural study. *Histology & Histopathology*. **10**: 91, 1995.
- HAGBERG, B.; JOLLBERG, H.; SOURANDER, P.; AKESSON, H. O. Infantile globoid cell leucodystrophy (Krabbe's disease): A clinical and genetic study of 32 Swedish cases 1953-1967. *Neuropædiatrie* **1**:74, 1970.
- HAGBERG, B. The clinical diagnosis of Krabbe's infantile leucodystrophy. *Acta Paediatr Scand* **52**: 213, 1963.
- HARA, Y.; NISHIMOTO, J.; SUZUKI, K. Effects of double amino-acid substitution polymorphism in acid β -galactosidase in two inbred strains of mice. *Biochim Biophys Acta* **1217**: 49, 1994.

- HITMAIR, K.; WIMBERGER, D.; WIESBAUER, P.; ZEHETMAYER, M.; BUDKA, H. Early infantile form of Krabbe disease with optic hypertrophy: serial MR examinations and autopsy correlation. *Ajnr: American Journal of Neuroradiology*. **15**: 1454, 1994.
- HOBBS, J. R.; BARETT, A. J.; CHAMBERS, D.; JAMES, D. C. O.; HUGH-JONES, K.; BYROM, N.; HENRY, K.; LUCAS, C. F.; ROGERS, T. R. BENSON, P. F. TANSLEY, L. R.; PATRICK, A. D.; MOSSMAN, J.; YOUNG, E. P. Reversal of clinical features and biochemical improvement after treatment by bone marrow transplantation. *Lancet* **II**: 709, 1981.
- HOOGERBRUGGE, P. M.; SUZUKI, K.; SUZUKI, K.; POORTHUIS, B. J. H. M.; KOBAYASHI, T.; WAGEMAKER, G.; VAN BEKUM, D. W. Doner-derived cells in the central nervous system of twitcher mouse after bone marrow transplantation. *Science* **239**: 1035, 1988.
- IDA, H.; RENNERT, O. M.; WATABE, K.; ETO, Y.; MAEKAWA, K. Pathological and biochemical studies of fetal Krabbe disease. *Brain & Development*. **16**: 480-484, 1994.
- IGSU, H.; SUZUKI, K. Progressive accumulation of toxic metabolite in a genetic leukodystrophy. *Science* **224**: 754, 1984.
- KOLODNY, E. H.; RAGAVAN, S.; KRIVIT, W. Late-onset Krabbe disease (globoid cell leukodystrophy): Clinical and biochemical features of 15 cases. *Dev Neurosci* **13**: 322, 1991.
- KOLODNY, E. H.; GAMA SOSA, M. A.; DE GASPERI, R.; BATTISTINI, S.; SARTORATO, E. L.; YERETSIAN, J.; MACFARLANE, H.; GUSELLA, J. Molecular genetics of late-onset Krabbe disease. *Am J Hum Genet Suppl* **54**: A217.
- KRABBE, K. A new familial, infantile form of diffuse brain sclerosis. *Brain*. **39**: 74, 1916.

- KRIVIT, W.; WHITLEY, C. B.; CHANG, P.-N.; SHAPIRO, E.; BELANI, K. G.; SNOVER, D.; SUMMERS, C. G.; BLAZER, B. Lysosomal storage diseases treated by bone marrow transplantation: Review of 21 patients, in Johnson FL, Pochedly C (eds). *Bone Marrow Transplantation in Children*. New York, Raven, 1990, p 261.
- KRIVIT, W.; PIERPONT, M. E.; AYATZ, K.; TSAI, M.; RAMSAY, N. K. C.; KERSEY, J. H.; WEISDORF, S.; SIBLEY, R.; SNOVER, D.; MACGOVERN, M. M.; SCHWARTZ, M. F.; DESNICK, R. J. Bone marrow transplantation in the Maroteaux-Lamy syndrome (Mucopolysaccharidosis VI). *N Engl J Med* **311**: 1606, 1984.
- KNUDSON, A. G. Founder effect in Tay Sachs disease. *Am J Hum Genet* **25**: 108, 1973.
- LUZI, P.; RAFI, M. A.; WENGER, D. A. Characterization of the large deletion in the GALC gene found in patients with Krabbe disease. *Hum Molec Genet* **12**: 2335, 1995a.
- LUZI, P.; RAFI, M. A.; WENGER, D. A. Structure and organization of the human galactocerebrosidase (GALC) gene. *Genomics* **26**:407, 1995b.
- LUZI, P.; RAFI, M. A.; WENGER, D. A. Krabbe disease: correlations between mutations in the GALC gene, GALC activity and clinical presentation. *Am J Hum Genet Suppl* **57**:A245, 1995c.
- LUZI, P.; RAFI, M. A.; WENGER, D. A. Multiple mutations in the GALC gene in a patient with adult-onset Krabbe disease. *Ann Neurol* **40**:116, 1996.
- LYERLA, T. A.; KONOLA, J. T.; SKIBA, M. C.; RAGHAVAN, S. Galactocerebrosidase activity in somatic cell hybrids derived from *twitcher* mouse/control human fibroblasts is associated with human chromosome 17. *Am J Hum Genet* **44**: 198, 1989.
- LYON, G.; ADAMS, R. D.; KOLODNY, E. H. *Neurology of Hereditary Metabolic Diseases of Children*. MacGraw-Hill (2a.ed.), 1996.

- MAKITA,, A. Biochemistry of organ glycolipids II. Isolation of human kidney glycolipids. *J Biochem (Tokyo)* **55**: 269, 1964.
- MANIATIS, T.; FRITISCH, E. F.; SAMBROOK, J. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, USA, 1990.
- MCKELVIE, P.; VINE, P.; HOPKINS, I.; POULOS, A. A case of Krabbe's leukodystrophy without globoid cells. *Pathology* **22**: 235, 1990.
- MEHL, E.; JATZKEWITZ, H. Evidence for genetic block in metachromatic leucodystrophy (ML). *Biochem Biophys Res Comm* **19**: 407, 1965.
- MORELL, P.; RADIN, N. S. Synthesis of cerebroside by brain from uridine diphosphate galactose and ceramide containing hydroxy fatty acid. *Biochemistry* **8**: 506, 1969.
- MYATAKE, T.; SUZUKI, K. Globoid cell leukodystrophy: Additional deficiency of psychosine galactosidase. *Biochem Biophys Res Commun* **48**: 538, 1972.
- MYATAKE, T.; SUZUKI, K. Additional deficiency of psychosine galactosidase in globoid cell leukodystrophy: Implication for enzyme replacement therapy. *Birth Defects* **9**: 136, 1973.
- MYRANTHOPOULOS, N. C.; NAYLOR, A. F.; ARONSON, S. M. Founder effect in Tay Sacks disease unlikely. *Am J Hum Genet* **25**: 108, 1973.
- NAKAI, K.; SAKAMOTO, H. Construction of a novel database containing aberrant splicing mutations of mammalian genes. *Gene* **14**: 171, 1994.
- O'BRIEN, J. S.; SAMPSON, E. L.; STERN, M. B. Lipid composition of mielin from peripheral brain maturation. *J. Neurochem* **14**: 357, 1967.
- OEHLMANN, R.; ZLOTOGORA, J.; WENGER, D. A.; KNOWLTON, R. G. Localization of Krabbe disease gene (GALC) on chromosome 14 by multipoint linkage analysis. *Am J Hum Genet* **53**: 1250, 1993.

- OLSSON, R.; SOURANDER, P.; SVENNERHOLM, L. Experimental studies on the pathogenesis of leukodystrophies I. The effect of intracerebrally injected sphingolipids in the rat brain. *Acta Neuropathol (Berl)* **6**: 157, 1966.
- ORITA, M.; IWAHANA, H.; KANAZAWA, H.; HAYASHI, K.; SEKIYA, T. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 2766-2770, 1989.
- RAFI, M. A.; LUZI, P.; CHEN, Y. Q.; WENGER, D. A. A large deletion together with a point mutation in the GALC gene is a common mutant allele in patients with infantile Krabbe disease. *Hum Molec Genet* **4**: 1285, 1995.
- RAFI, M.; LUZI, P.; ZLOTOGORA, J.; WENGER, D. A. Two different mutations are responsible for Krabbe disease in the Druze and Molem Arab populations in Israel. *Hum Genet* **97**: 304, 1996.
- SAKAI, N.; INUI, K.; FUJII, N.; FUKUSHIMA, H.; NISHIMOTO, J.; YANAGIHARA, I.; ISEGAWA, Y.; IWAMATSU, A.; OKADA, SHINTARO. Krabbe disease: isolation and characterization of a full-length cDNA for human galactocerebrosidase. *Biochem Biophys Res Commun* **198**: 485, 1994.
- SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **74**: 5463, 1977.
- SOUTHERN, E. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* **98**: 503, 1975.
- SHAPIRO, E. G.; LOCKMAN, L. A.; BALTHAZOR, M.; KRIVIT, W. Neuropsychological outcomes of several storage diseases with and without bone marrow transplantation. *J Inherit Metab Dis* **18**: 413, 1995.
- SUZUKI, K.; GROVER, W. D. Krabbe's leukodystrophy (globoid cell leukodystrophy): An ultrastructural study. *Arch Neurol* **22**: 385, 1970.

- SUZUKI K.; SCHNEIDER, E. L.; EPSTEIN, C.J. In utero diagnosis of globoid cell leukodystrophy (Krabbe's disease). *Biochem Biophys Res Commun* **45**: 1363, 1971.
- SUZUKI, K.; SUZUKI, Y. Globoid cell leucodystrophy (Krabbe's disease): Deficiency of galactocerebroside β -galactosidase. *Proc Natl Acad Sci USA* **66**: 302, 1970.
- SUZUKI, Y.; SUZUKI, K. Krabbe's globoid cell leukodystrophy: Deficiency of galactocerebroside in serum, leukocytes and fibroblasts. *Science* **171**: 73, 1971.
- SUZUKI, K.; SUZUKI, Y.; SUZUKI K. Galactosylceramide lipidosis: Globoid-cell leukodystrophy (Krabbe disease). In Scriver, C. R.; Beaudet, A. L.; Sly, W. S.; Valle, D. (eds). *The metabolic and molecular basis of inherited disease*. McGraw-Hill, pp. 2671, 1995.
- TANAKA, H.; SUZUKI, K. Substrate specificities of the two genetically distinct human brain β -galactosidases. *Brain Res* **122**: 325, 1977.
- TANIIKE, M.; SUZUKI, K. Spacio-temporal progression of demyelination in *twitcher* mouse: with clinic-pathological correlation. *Acta Neuropathological*. **88(3)**: 228, 1994.
- TATSUMI, N.; INUI, K.; SAKAI, N.; FURUSHIMA, H.; NISHIMOTO, J.; YANAGIHARA, I.; NISHIGAKI, T.; TSUKAMOTO, H.; FU, L.; TANIIKE, M.; OKADA, S. Molecular defects in Krabbe disease. *Hum Mol Genet* **4**: 1865, 1995.
- UMEZAWA, F.; ETO, Y.; TOKORO, T.; ITO, F.; MAEKAWA, K. Enzyme replacement with liposomes containing β -galactosidase from *Charonia lampas* in murine globoid cell leukodystrophy (*twitcher*). *Biochem Biophys Res* **127**: 663, 1985.

- VANIER, M-T.; SVENNERHOLM, L. Chemical pathology of Krabbe's disease III. Ceramide hexosides and gangliosides of brain. *Acta Paediatr Scand* **64**: 641, 1975.
- VANIER, M-T.; SVENNERHOLM, L. Chemical pathway of Krabbe's disease: The occurrence of psychosine and other neutral sphingoglycolipids. *Adv Exp Med Biol* **68**: 115, 1976.
- VERDRU, P.; LAMMENS, M.; DOM, R.; van ELSEN, A.; CARTON, H. Globoid cell leukodystrophy. *Neuroradiology* **32**: 520, 1990.
- VIDAUD, M.; GATTONI, R.; STEVENIN, J.; VIDAUD, D.; AMSELEM, S.; CHIBANI, J.; ROSA, J. A 5' splice-region G→C mutation of the human β -globin gene inhibits pre-mRNA splicing: a mechanism for β^+ -thalassemia. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 1041, 1989.
- VITORIA, T.; RAFI, M. A.; WENGER, D. A. Cloning of the canine GALC cDNA and identification of the mutation causing globoid cell leukodystrophy in west highland white and cairn terriers. *Genomics* **33**:457, 1996.
- WENGER, D. A.; SATTLER, M.; MARKEY, S. P. Deficiency of monolactosyl diglyceride β -galactosidase activity in Krabbe's disease. *Biochem Biophys Res Commun* **53**: 680, 1973.
- WENGER, D. A.; SATTLER, M.; HIATT, W. Globoid cell leukodystrophy: Deficiency of lactosylceramide beta-galactosidase. *Proc Natl Acad Sci USA* **71**: 584, 1974.
- WENGER, D. A.; RICCARDI, V. M. Possible misdiagnosis of Krabbe disease. *J Paediatr* **88**: 76, 1976.
- WENGER, D.; WILLIAMS, C. Screening for lysosomal disorders In: Hommes, E. A. (Ed) Techniques in diagnostic human biochemical genetics. Wiley-Liss, New York, pp587-617, 1991.

WENGER, D. A.; CHEN, Y. Q.; Krabbe disease (globoid cell leukodystrophy). In: Rosenberg, R. N.; Barchi, R. L.; Prusiner, S. B.; Di Mauro, S.; Kunkel, L. M. (eds) The molecular and genetic basis of neurological disease. Butterworth-Heinemann, Boston, pp 485-495, 1993.

ZLOTOGOLA, J.; ZEIGLER, M.; BACH, G. Selection in favor of lysosomal storage disorders? *Am J Hum Genet* **42**: 271, 1988.

Dedicatória

É pra você que escrevo, hipócrita. Para você - sou eu que te sacudo os ombros e grito verdades nos ouvidos, no último momento. Me jogo aos teus pés inteiramente grata: bofetada de estalo, decolagem lancineante, baque de fuzil. É só pra voce e que letra tão hermosa - Exaltação - Império Sentido na Avenida - Carnaval da síncope. Pratos limpos atirados para o ar. Circo instantâneo, pano rápido mas exato descendo sobre sua cabeleira de um só golpe de carícia, e o teu espanto.

Ana Cristina César