**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**

DANIEL FANTOZZI GARCIA

**Análise do perfil genotípico de pacientes com galactosemia clássica e
estudo da relação do genótipo com o fenótipo**

Ribeirão Preto

2015

DANIEL FANTOZZI GARCIA

**Análise do perfil genotípico de pacientes com galactosemia clássica e
estudo da relação do genótipo com o fenótipo**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências

Área de concentração: Genética

Orientador: Prof. Dr.

Wilson Araújo da Silva Júnior

Coorientador: Prof. Dr.

José Simon Camelo Junior

Ribeirão Preto

2015

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo da Publicação

Garcia, Daniel Fantozzi

Análise do perfil genotípico de pacientes com galactosemia clássica e estudo da relação do genótipo com o fenótipo / Daniel Fantozzi Garcia; Ribeirão Preto, 2015.

118p.:il.;30cm

Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2015.

Programa de Pós Graduação em Genética

Orientador: Wilson Araújo da Silva Júnior

Coorientador: José Simon Camelo Junior

Descritores: 1. Galactosemia clássica 2. *GALT* 3. Galactosemia Duarte 4. Galactosemia tipo II 5. *GALK1* 6. Galactose 7. Mutações

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Haroldo e Maria Luiza, com amor e gratidão pelo apoio incondicional e por estarem sempre presentes.

À minha esposa Maria Fátima, com amor, por sua compreensão, carinho, presença e incansável apoio.

À minha querida filha recém-chegada Lorena, que me trouxe o verdadeiro significado da palavra amor.

À todos os professores que passaram por minha vida, pelos ensinamentos e valores compartilhados.

AGRADECIMENTOS

Todo meu afeto, amizade e gratidão:

Ao meu orientador Prof. Dr. Wilson Araújo da Silva Júnior, por sua paciência, apoio, disponibilidade, e por ser o grande responsável por conduzir meu aprendizado sobre métodos laboratoriais no campo da biologia molecular.

Ao meu coorientador Prof. Dr. José Simon Camelo Junior, por despertar meu interesse no campo dos erros inatos do metabolismo, pelo apoio e confiança depositada no meu trabalho. Seu incentivo e sua colaboração foram muito importantes para a conclusão deste estudo.

Ao meu querido e eterno professor Dr. Joao Monteiro de Pina Neto, por tudo que me ensinou de medicina humanista numa área tão científica como a genética médica.

À Dra. Marlene de Fátima Turcato, pelo convívio e aprendizado valioso no ambulatório de erros inatos do metabolismo.

À todos os docentes do departamento de genética, que tiveram uma importante contribuição na minha formação médica e científica, em especial: Ester Silveira Ramos, Lucia Regina Martelli, Victor Evangelista de Faria Ferraz, Aguinaldo Luiz Simões, David de Jong, Nilce Maria Martinez Rossi, Fábio de Melo Sene.

À Susie Nalon e Silvia, secretárias do departamento de Genética e Meire Tarlá, secretária do LGMB, por toda ajuda e carinho.

À todos os pacientes com galactosemia e familiares, pela lição de vida, pela participação, e compreensão da importância deste estudo.

A Cristiane Ayres, Adriana A Marques, Greice Molfetta, e Ane Dinarte, que me auxiliaram durante os experimentos de bancada e muito me ensinaram, sempre solícitas e prestativas.

Aos meus queridos colegas de Pós-graduação do departamento de genética, do laboratório de Genética Molecular e Bioinformática e da residência médica.

À todos os médicos que cederam dados clínicos dos pacientes e amostras para a realização deste estudo: Dra. Carolina Fischinger Moura de Souza; Dra. Gilda Porta; Dr. Carlos E. Steiner; Dr. José Eduardo Goes; Dr. Fernando Regla Vargas; Dra. Maria Angélica Lima; Dra. Carolina Araújo Moreno; Dra. Nancy Cordovani; Dr. Hector Yuri Conti Wanderley; Dr. Ruy Pires de Oliveira Sobrinho.

À Dayse Oliveira Alencar, pela realização do estudo de ancestralidade de alguns pacientes no Laboratório de Genética Humana e Médica da Universidade Federal do Pará.

Aos Doutores Aguinaldo Luiz Simões, Léa Maria Zanini Maciel e Wilson Marques Junior, pelas importantes considerações construtivas durante o exame de qualificação.

Por fim, agradeço a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos”

(Isaac Newton)

RESUMO

Garcia, Daniel Fantozzi. **Análise do perfil genotípico de pacientes com galactosemia clássica e estudo da relação do genótipo com o fenótipo.** 2015. 118f. Tese (Doutorado) – Departamento de Genética – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, SP, 2015.

A galactosemia clássica ou tipo I (GC) é um erro inato do metabolismo da galactose causada pela deficiência da enzima galactose-1-fosfato uridiltransferase (GALT). É transmitida como uma doença autossômica recessiva e é tipicamente caracterizada pela intolerância neonatal a galactose, com complicações que vão desde icterícia, para os casos mais leves, à insuficiência hepática nos mais graves, e às complicações tardias, como disfunções motoras e reprodutivas. A galactosemia também é heterogênea do ponto de vista molecular, com 266 mutações diferentes descritas no gene *GALT*, algumas específicas para certas populações, refletindo o que se espera de alguns eventos de efeito fundador. O objetivo deste trabalho foi avaliar o perfil de mutações no gene *GALT*, dos pacientes brasileiros com galactosemia clássica e fazer um estudo da correlação do genótipo com o fenótipo, uma vez que se sabe que parte da variação observada na evolução clínica está relacionada com o nível de atividade residual da enzima e do genótipo. Para tanto, foram incluídos no estudo 31 pacientes com o diagnóstico bioquímico de galactosemia de diversas regiões do Brasil, que tiveram seus dados clínicos obtidos a partir de revisão de prontuários médicos e preenchimento de ficha clínica. Foi realizado o sequenciamento genético direto bidirecional do gene *GALT* e também estudos adicionais, como genotipagem do gene *GALK1* de um paciente, estudo de ancestralidade de sete pacientes, além de simulações de patogenicidade *in silico* das novas mutações identificadas. Os principais achados clínicos dos pacientes que participaram deste estudo foram hepatomegalia, icterícia, baixo ganho pondero-estatural, vômito recorrente, anemia e catarata. As principais mutações que causam GC descritas na literatura foram identificadas neste estudo, como por exemplo, a p.Q188R, p.S135L e p.K285N, bem como o alelo Duarte 2 e seis mutações novas, p.M1T, p.R33S, p.P73S, IVS3+1G>A, IVS4+4A>C e p.Q169P. Este resultado era esperado, dada a elevada miscigenação da população brasileira. Alguns indivíduos foram diagnosticados através do teste de triagem neonatal expandido, que não está disponível rotineiramente a todos os recém-nascidos, portanto, começaram o tratamento dietético antes de desenvolverem os sinais e sintomas da doença. Para estes indivíduos não foi possível fazer uma análise da relação genótipo-fenótipo. Para os demais indivíduos esta relação foi consistente com o que é descrito na literatura, com os indivíduos homozigotos para a mutação p.Q188R com uma evolução mais grave do que os indivíduos que tinham pelo menos uma mutação p.S135L. Para os indivíduos com as mutações novas, foi observado um amplo espectro de fenótipos, como de pacientes que foi a óbito por insuficiência hepática e sepse à um caso assintomático. Este estudo amplia o espectro de mutação no gene *GALT* descrito na literatura e reforça a importância tanto do diagnóstico precoce quanto da introdução do tratamento dietético; também acrescenta mais evidências para a discussão sobre a introdução da galactosemia no programa de triagem neonatal do Brasil, onde a incidência da doença é estimada em cerca de 1:20.000.

Palavras-chave: Galactosemia. Sequenciamento genético. Mutações. *GALT*. Galactosemia Duarte. Galactosemia tipo II. *GALK1*. Galactose.

ABSTRACT

Garcia, Daniel Fantozzi. **Genotypic profile of patients with classic galactosemia and study of the genotype-phenotype correlation.** 2015. 118f. PhD thesis – Department of Genetics – Ribeirão Preto School of Medicine – São Paulo University, SP, 2015.

Classical galactosemia (CG) or type I galactosemia is an inborn error of galactose metabolism caused by the deficiency of the galactose-1-phosphate uridylyltransferase enzyme (GALT). It is transmitted as an autosomal recessive disease and is typically characterized by neonatal galactose intolerance, with complications ranging from neonatal jaundice and liver failure to late complications, such as motor and reproductive dysfunctions. Galactosemia is also heterogeneous from a molecular standpoint, with 266 mutations described to date in the *GALT* gene, some of them specific to certain populations, reflecting what is expected as some events of founder effect. The objective of this study was to evaluate the profile of mutations in the *GALT* gene of Brazilian patients with classical galactosemia and perform a genotype-phenotype correlation study, since it is known that part of the observed variation in clinical outcome is related to the level of residual enzyme activity and genotype. Therefore, this study included 31 patients with biochemical diagnosis of galactosemia from different regions of Brazil, who had their clinical data obtained from review of medical records and from a standardized case report form. We conducted a direct bidirectional sequencing of the *GALT* gene and also additional studies, as *GALK1* genotyping for a patient, ancestrality study of seven patients and *in silico* simulation of pathogenicity for the new mutations identified. The main clinical features of the patients in this study were hepatomegaly, jaundice, low weight and height gain, recurrent vomiting, anemia and cataract. The major CG causing mutations described in the literature have been identified in this study, for example, p.Q188R, p.S135L and p.K285N, as well as the Duarte 2 allele and six novel mutations: p.M1T; p.R33S; p.P73S; IVS3+1G>A; IVS4+4A>C and p.Q169P. This result was expected, given the high miscegenation of the Brazilian population. Some individuals were diagnosed through expanded newborn screening test, which is not available routinely to all newborns, and so began dietary treatment before they develop signs and symptoms of the disease. For these individuals, was not possible to analyze the genotype-phenotype correlation. For other individuals this relationship was consistent with what is described in the literature, with the homozygous for p.Q188R mutation presenting a more severe phenotype than individuals who had at least one p.S135L mutation. For individuals with new mutations, was observed a wide range of phenotypes, from patients who died due to liver failure and sepsis to an asymptomatic case. This study expands the spectrum of mutations in the *GALT* gene described in the literature and reinforces the importance of early diagnosis and the introduction of dietary treatment; also adds more evidence to the discussion on the introduction of galactosemia in the neonatal screening program of Brazil, where the incidence of the disease is estimated at about 1:20,000.

Keywords: Galactosemia. Genetic sequencing. Mutations. GALT. Duarte galactosemia. Galactosemia type II. GALK1. Galactose.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3'UTR	<i>3' untranslated region</i>
5'UTR	<i>5' untranslated region</i>
α	alfa
ATP	adenosina trifosfato
β	beta
°C	grau Celsius
μ L	microlitro
μ M	micromolar
A	alanina
BGPE	baixo ganho ponderoestatural
C	cisteína
C14	carbono 14
cDNA	DNA complementar
ChoRE	Elemento de resposta à carboidratos
D	dextrogiro ou ácido aspártico (conforme o contexto)
Da	Dalton
<i>D. melanogaster</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
dup	duplicação
DNA	ácido desoxirribonucleico
dNTP	desoxirribonucleotídeo
E	ácido glutâmico
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	ácidoetilenodiamino tetra-acético
Egr1	<i>Early growth response protein 1</i> (<i>zinc finger protein 225</i>)
EIM	erros inatos do metabolismo

ESE	<i>exon splice enhancer</i>
<i>et al.</i>	e outros
F	fenilalanina
fs	mudança de matriz de leitura (<i>frame-shift</i>)
G	glicina
g/dl	gramas por decilitro
GalNAc	N-acetilgalactosamina
GALE	UDP-galactose-4'-epimerase
GALM	galactose mutarotase
GALK	galactoquinase
<i>GALK1</i>	<i>galactoquinase gene</i>
GALK(P)	variante "Filadélfia" da GALK
GALT	galactose-1-fosfato uridil transferase
<i>GALT</i>	<i>galactose-1-fosfato uridil transferase gene</i>
GC	galactosemia clássica
H	histidina
HCRP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo
I	isoleucina
IVS	sequência intercalar (<i>InterVening Sequence</i>)
K	lisina
<i>K. lactis</i>	<i>Kluyveromyces lactis</i>
kb	quilobases
L	leucina
LGMB	Laboratório de Genética Molecular e Bioinformática
M	metionina
mg/kg	miligramas por quilograma
mM	milimolar

mRNA	ácido ribonucleico mensageiro
N	asparagina
Na ⁺	sódio catiônico
NAD ⁺	Dinucleótido de nicotinamida e adenina oxidado
NADPH ⁺	Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina oxidado
ng	nanograma
nm	nanômetro
nmol/min/gHb	nanomol por minuto por grama de hemoglobina
p	braço curto do cromossomo (<i>petit</i>)
ORF	fase de leitura aberta (<i>open reading frame</i>)
P	prolina
Q	glutamina
R	arginina
S	serina
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SGLT1	cotransportador de glicose sódio dependente
Sp1	<i>specificity protein 1</i>
T	treonina
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
UDP	uridina difosfato
UMP	uridina monofosfato
V	valina
W	triptofano
WHO	<i>World Health Organization</i>
X ou *	códon de parada (<i>stop codon</i>)
Y	tirosina

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Representação esquemática do dissacarídeo lactose e os respectivos monossacarídeos que a compõe: galactose e glicose	17
Figura 2 -	Metabolização da β -D-galactose em glicose-1-fosfato através da via de Leloir.....	19
Figura 3 -	Via alternativa do metabolismo da galactose através da pirofosforilase dependente de UTP.....	20
Figura 4 -	Duas outras metabolizações alternativas da galactose: a conversão à galactitol e a via do galactonato, que termina no ciclo das pentoses.....	21
Figura 5 -	Estrutura e organização do gene <i>GALT</i> humano. O tamanho dos introns e éxons está representado em escala.....	23
Figura 6 -	Representação estrutural da GALT de <i>E. coli</i> . As subunidades do dímero estão representadas em azul e vermelho, com a posição dos metais indicadas por pequenas esferas. Cada sítio ativo contém UDP-glicose	23
Figura 7 -	Tipos de mutação descritas no gene <i>GALT</i>	23
Figura 8 -	Mutações documentadas no gene <i>GALT</i>	25
Figura 9 -	Fluxograma sugerido de investigação para um paciente com suspeita de ter um erro inato do metabolismo da galactose	31
Figura 10 -	Origem e relação entre os principais haplótipos <i>GALT</i>	34
Figura 11 -	Cromatograma das mutações novas no gene <i>GALT</i> identificadas neste estudo.....	58
Figura 12 -	Cromatograma das mutações identificadas no gene <i>GALK1</i> do paciente com galactosemia tipo II	59
Figura 13 -	Proporção de marcadores polimórficos bialélicos do tipo INDEL característicos de três grupos de populações ancestrais (Europeu, Africano e Ameríndio) em alguns pacientes deste estudo	60
Figura 14 -	Sequencia normal do éxon 2 e de parte dos introns adjacentes do gene <i>GALK1</i>	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Principais achados clínicos de 270 neonatos sintomáticos com galactosemia - WAGGONER et al	29
Tabela 2 -	<i>Primes</i> usados nas PCRs e tamanho dos <i>amplicons</i> do gene <i>GALT</i>	46
Tabela 3 -	<i>Primes</i> usados nas PCRs e tamanho dos <i>amplicons</i> do gene <i>GALK1</i>	46
Tabela 4 -	Dados clínicos e dosagem da atividade da GALT em eritrócitos.....	53-54
Tabela 5 -	Resultado do sequenciamento do gene <i>GALT</i>	55-56
Tabela 6 -	Detalhes das mutações encontradas	57

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1. A galactose	17
1.2. O metabolismo da galactose.....	18
1.3. Os genes e as enzimas.....	22
1.3.1. <i>GALT</i>	22
1.3.2. <i>GALK1</i>	24
1.3.3. <i>GALE</i>	26
1.4. Os defeitos hereditários no metabolismo da galactose.....	26
1.4.1. A galactosemia clássica	26
1.4.1.1. Breve histórico	26
1.4.1.2. Aspectos clínicos da galactosemia clássica	27
1.4.1.3. Diagnóstico	30
1.4.1.4. Aspectos genéticos da galactosemia clássica	31
1.4.2. A galactosemia tipo II	34
1.4.1. A galactosemia tipo III	36
2. OBJETIVOS.....	38
3. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA	40
4. MATERIAIS E MÉTODOS	42
4.1. Pacientes	43
4.2. Aspectos éticos	43
4.3. Avaliação clínica	43
4.4. Dosagem da atividade enzimática da <i>GALT</i>	44
4.5. Análise molecular.....	44
4.5.1. Extração do DNA de leucócitos	44
4.5.2. Reação em cadeia da polimerase (PCR) – gene <i>GALT</i>	45

4.5.3. Reação em cadeia da polimerase (PCR) – gene <i>GALK1</i>	45
4.5.4. Sequenciamento dos fragmentos de DNA.....	47
4.6. Análises <i>in silico</i>	47
4.7. Estudo de ancestralidade de alguns pacientes	48
5. RESULTADOS.....	49
5.1. Fenótipo de genótipo	50
5.2. Simulações <i>in silico</i>	51
5.3. Dados de estudo de ancestralidade	60
6. DISCUSSÃO	61
7. CONCLUSÕES	70
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72
9. APÊNDICES	81
9.1. Apêndice A – Termo de consentimento livre e esclarecido	82
9.2. Apêndice B – Protocolo clínico - galactosemia	88
9.3. Apêndice C – <i>GALT</i> : Sequência genômica e proteica destacando posição dos <i>primers</i> e mutações encontradas.	90
9.4. Apêndice D – <i>GALK1</i> : Sequência genômica e proteica destacando posição dos <i>primers</i> e mutações encontradas.	93
9.7. Apêndice E – Cromatogramas do sequenciamento dos pacientes com galactosemia deste estudo, destacando as mutações encontradas no gene <i>GALT</i>	96
9.8. Apêndice F – Resultado completo das simulações <i>in silico</i>	100
9.9. Apêndice G – Tabela resumo dos resultados	101
9.10. Apêndice H – Artigo que será submetido para publicação no <i>Human Mutation</i>	102

1. INTRODUÇÃO

1.1. A galactose

A β -D-galactose (galactose) é um monossacarídeo epímero da β -D-glicose (glicose), e ambos pertencem ao grupo das D-aldohexoses. A galactose, em ligação glicosídica com a glicose, forma o dissacarídeo lactose [figura 1], que é o principal açúcar do leite e de alimentos derivados do leite. A galactose também é encontrada na forma livre em algumas frutas e legumes e em ligação glicosídica com outros produtos vegetais, entretanto, estas fontes não têm contribuição significativa na quantidade total de galactose da dieta humana (BERRY et al 1993).

Figura 1 - Representação esquemática do dissacarídeo lactose e os respectivos monossacarídeos que a compõe: galactose e glicose.

O leite é o único alimento que os filhotes dos mamíferos ingerem até o desmame e no caso dos humanos, é recomendado que o leite materno seja o alimento exclusivo até o sexto mês de vida (KRAMER & KAMUMA, 2012). Após esta idade, os bebês devem receber complementação nutricional com outros alimentos e manter o aleitamento materno até dois anos ou mais (WHO 2003). Além do leite materno, o leite de animais domesticados, principalmente o de vaca, constitui parte importante da alimentação humana de crianças e adultos em muitos países. A concentração de lactose no leite de diferentes

espécies de mamíferos varia consideravelmente. O leite humano contém de 5,5 a 7 g/dl de lactose, enquanto o teor de lactose do leite de vaca é, em média, cerca de 5 g/dl (FUSCH et al 2014).

Além da galactose proveniente da lactose da dieta, existe produção endógena de galactose a partir de glicose, a uma taxa média de 0,53 a 1,05 mg/kg por hora. Acredita-se que esta fonte de galactose possa ser um fator importante na patogênese de algumas complicações tardias que são observadas na galactosemia, e poderia explicar a elevação persistente de metabólitos de galactose em pacientes, apesar da restrição dietética (BERRY et al 1995).

A lactose ingerida é rapidamente hidrolisada em galactose e glicose pela lactase [$\beta(1\rightarrow4)$ dissacaridase], presente nas células do epitélio intestinal (GREY et al 1969), e tanto a galactose quanto a glicose são absorvidas ativamente através da “borda em escova” dos enterócitos pelo cotransportador $\text{Na}^+/\text{açúcar}$ – SGLT1 (WRIGHT et al 2003). A galactose, que é um C-4 epímero da glicose, é uma fonte essencial de energia aos recém-nascidos, mas para entrar na via glicolítica, é necessário que seja metabolizada em glicose-1-fosfato. A maior parte desta metabolização ocorre no fígado (HOLTON et al 2001).

1.2. O metabolismo da galactose

A via metabólica da galactose começou a ser delineada entre 1948 e 1951, principalmente através dos trabalhos de Leloir e colaboradores em leveduras e bactérias (LELOIR 1951; FREY 1996). Por este motivo, esta via é chamada de via de Leloir e representa a conversão da β -D-galactose em glicose-1-fosfato, pela ação de quatro enzimas [figura 2]. O primeiro passo desta via é a epimerização da β -D-galactose em α -D-galactose que é catalisada pela galactose mutarotase (GALM, EC 5.1.3.3). O segundo passo envolve a fosforilação da α -D-galactose em galactose-1-fosfato pela ação da galactokinase (GALK1, EC 2.7.1.6). A galactose-1-fosfato uridil transferase (GALT, EC 2.7.7.12) catalisa a transferência de um grupo UMP da UDP-glicose para a galactose-1-fosfato, produzindo glicose-1-fosfato e UDP-galactose. Para

finalizar o processo, a UDP-galactose volta a ser convertida em UDP-glicose pela UDP-galactose-4'-epimerase - GALE, EC 5.1.3.2 (HOLDEN et al 2003).

Figura 2 - Metabolização da β -D-galactose em glicose-1-fosfato através da via de Leloir.

Como fonte de energia, a galactose é similar à glicose. Uma molécula de ATP é necessária para converter galactose em galactose-1-fosfato, e sua posterior transformação em glicose-6-fosfato pela ação da fosfoglicomutase permite seu metabolismo através da glicólise. O metabolismo da glicose através da glicólise também necessita de uma molécula de ATP, pois é necessário que ela seja fosforilada a glicose-6-fosfato (FREY 1996).

A descoberta e caracterização da UDP-glicose por Leloir foi a primeira descrição de um açúcar nucleotídeo, e a importância da via vai além da produção de glicose-1-fosfato. A galactose serve também como fonte de UDP-glicose para a síntese de glicogênio, e a UDP-galactose é um cofator essencial para as galactose transferases, que estão envolvidas na incorporação de galactose nas glicoproteínas e glicolipídeos (LELOIR 1951; HOLTON et al 2001).

A principal via metabólica da galactose é a de Leloir, entretanto existem pelo menos três vias alternativas bem conhecidas: a da pirofosforilase; a redução a galactitol e; a oxidação a galactonato.

A primeira via alternativa descrita foi a da pirofosforilase. Isselbacher e colaboradores observaram que alguns pacientes com galactosemia, com o passar do tempo, aumentavam a capacidade de metabolizar a galactose da dieta. Assim, eles conduziram um experimento em células de fígado de ratos com galactose marcada com C14 e demonstraram a existência desta via, além do fato de que ela é menos ativa no período fetal e neonatal (ISSELBACHER 1957). A via de pirofosforilação começa com a fosforilação da galactose em galactose-1-fosfato pela GALK seguido pela formação de UDP-galactose pela ação da pirofosforilase dependente de UTP. A UDP-galactose é convertida em UDP-glicose e uma segunda reação de pirofosforilação produz glicose-1-fosfato e UTP [figura 3]. A importância da via da pirofosforilase na metabolização da galactose é pequena. Foi demonstrado que a UDP-galactose pirofosforilase hepática humana tem 0,85% de efetividade quando comparada a uridil transferase em formar UDP-galactose (ABRAHAM & HOWELL 1969).

A segunda via alternativa da metabolização da galactose é a sua redução à galactitol pela aldose redutase (poliol:NADP+ óxido-redutase, EC1.1.1.21), enzima que pertence a via dos polióis no metabolismo dos carboidratos. O galactitol, entretanto, não é substrato para as enzimas seguintes da via dos polióis, e como não é metabolizado, acumula nos tecidos e urina. Acredita-se que este acúmulo de galactitol em pacientes com galactosemia esteja envolvido na fisiopatologia das lesões teciduais dos principais órgãos acometidos pela doença (JAKOBS et al 1995).

Figura 3 - Via alternativa do metabolismo da galactose através da pirofosforilase dependente de UTP. Observe que a GALK1 e a GALE também fazem parte da via de Leloir.

A terceira via foi inicialmente proposta por Cuatrecasas e Segal e não produz metabólitos da via convencional e nenhum intermediário fosforilado ou ligado a nucleotídeos. A primeira enzima, galactose desidrogenase dependente de NAD^+ (D-galactose: NAD^+ oxidoreductase EC1.1.1.48), oxida o grupo aldeído da galactose na presença de NAD^+ produzindo D-galactona-lactona, este por sua vez é convertido espontaneamente em D-galactonato. Na sequência, o D-galactonato é convertido em ácido β -ceto-D-galactônico, este em D-xilose e por fim em D-xilose fosfato, que entra no ciclo das pentoses fosfato (CUATRECASAS & SEGAL 1966) [figura4].

Figura 4 - Duas outras metabolizações alternativas da galactose: no canto superior esquerdo a conversão à galactitol; à direita e abaixo a via do galactonato, que termina no ciclo das pentoses.

Mutações nos genes que codificam as enzimas da via de Leloir podem produzir proteínas funcionalmente aberrantes, com atividade enzimática reduzida ou indetectável, resultando em doenças de herança mendeliana autossômicas recessivas, que são coletivamente conhecidas como galactosemia. Existem três tipos de galactosemia, classificadas conforme qual enzima da via está deficiente, sendo a deficiência da GALT a mais prevalente, que é conhecida como Galactosemia clássica (GC) ou galactosemia tipo I -

OMIM #230400 (ISSELBACHER et al 1956). A deficiência da galactoquinase causa a galactosemia tipo II - OMIM #230200 (GITZELMANN 1967) e da epimerase a forma mais rara de galactosemia, a tipo III - OMIM #230350 (HOLTON et al 1981).

Até o momento, nenhuma doença humana foi atribuída a mutações no gene que codifica a galactose mutarotase.

1.3. Os genes e as enzimas

1.3.1. GALT

O gene que codifica a GALT está localizado na região proximal do braço curto do cromossomo 9, em 9p13. Abrange cerca de 4,3 kb de DNA genômico com sequência codificadora disposta em 11 éxons. O cDNA tem 1295 bases de comprimento, sendo que a fase de leitura aberta (ORF) começa com o códon ATG da primeira metionina na base 29 e termina com o códon de parada TGA na base 1166 [figura 5]. O gene *GALT* codifica um polipeptídeo de 379 aminoácidos. A proteína funcional é um homodímero ativo com uma massa molecular estimada em 88 kDa [figura 6].

O gene foi clonado e caracterizado por Reichardt e Berg em 1988 e segundo o principal banco de dados de mutações (em http://www.arup.utah.edu/database/galactosemia/GALT_display.php), 266 mutações diferentes foram identificadas até o momento, a maioria delas (60%), mutações de sentido trocado (CALDERON et al 2010) [figura 7 e 8].

Gene GALT humano (NM_000155.2)

* O número do nucleotídeo (nt) é determinado a partir do primeiro nucleotídeo do códon da primeira metionina (ATG) do cDNA.

Figura 5 - Estrutura e organização do gene GALT humano. O tamanho dos introns e éxons estão representados em escala.

Figura 6 - Representação estrutural da GALT de *E. coli*. As subunidades do dímero estão representadas em azul e vermelho, com a posição dos metais indicadas por pequenas esferas. Cada sítio ativo contém UDP-glicose (Holden HM et al, 2003).

Figura 7 – Tipos de mutação descritas no gene GALT até janeiro e 2015 em http://www.arup.utah.edu/database/galactosemia/GALT_display.php.

O gene *GALT* é conservado nos eucariotos, principalmente os éxons 6, 9 e 10, apresentando uma média de similaridade de sequência de aminoácidos de 91,6% comparada com a do camundongo; 58,3% com *D. melanogaster* e; 48,4% com *S. cerevisiae*. (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/homologene?cmd=Retrieve&dopt=AlignmentScores&list_uids=126).

A região promotora do gene sugere que ele seja um gene tipo “housekeeping”, devido à presença de regiões ricas em GC, um domínio CAAT-box e sem TATA-box. Entretanto, existem evidências de que domínios regulatórios estejam envolvidos em expressão tecido-específicas com maior quantidade de mRNA sendo encontrada no fígado, ovário, cérebro e coração, como foi demonstrado em experimentos com ratos (HEIDENREICH et al 1993).

Os homólogos da *GALT* em *E. coli* (*GalT*) e *S. cerevisiae* (*GAL 7*) são altamente regulados, e a própria galactose induz sua expressão em mais de cem vezes nestes organismos, como uma alça de retroalimentação positiva, (JONHSTON 1987). Elsas e colaboradores demonstraram utilizando sistema de expressão duplo-repórter de luciferase a existência de domínios regulatórios positivos, como o motivo E-box (CACGTG), que pode representar o centro de uma região de resposta à glicose, também conhecido como elemento de resposta a carboidratos [ChoRE] (ELSAS et al 2001).

1.3.2. *GALK1*

O gene *GALK1* contém oito exons e ocupa aproximadamente 7,3 kb de DNA genômico, no braço curto do cromossomo 17, em 17p24. O cDNA foi isolado por Stabeliam e colaboradores em 1995, tem 1350 bases de comprimento e codifica uma proteína de 392 aminoácidos, com massa molecular de 42,3 kDa (STAMBOLIAN et al 1995).

A região promotora de gene *GALK1* é rica em GC, com diversos locais de ligação para o fator de transcrição Sp1 e ausência de TATA-box e CCAAT-box. A presença destas regiões, assim como de regiões de ligação de Egr-1 podem explicar a alta atividade de *GALK1* observada em neonatos (80–120 nmol/min/gHb), quando comparada com crianças maiores de um ano e adultos (20–30 nmol/min/gHb) (PARK et al 2009).

Figura 8 - Mutações no gene *GALT* documentadas até janeiro de 2015. A referência para cada mutação citada está disponível em http://www.arup.utah.edu/database/galactosemia/GALT_display.php.

Tedesco e colaboradores (1977) apresentaram evidências de que a atividade da galactokinase em eritrócitos é significativamente menor em populações negras americanas quando comparadas a grupos de indivíduos caucasianos, e concluiu que a diferença é devido a um polimorfismo, conhecida como a variante 'Filadélfia', simbolizada por GALK(P).

A deficiência da GALK1 causa a galactosemia tipo II e 33 mutações diferentes já foram descritas no gene *GALK1* no “*Human gene mutation database*” (HGMD® 2015 update - www.biobase-international.com/hgmd) (STENSON et al 2009).

Existe outra enzima, conhecida por GALK2, que apresenta 35% de homologia com a sequência de aminoácidos da GALK1 (STAMBOLIAN et al

1995). Estudos enzimáticos mostraram que a GALK2 humana é altamente eficiente como GalNAc-quinase, com atividade de galactoquinase quando este açúcar está presente em concentrações elevadas. Pastuszak e colaboradores (1996) afirmaram que, embora a GALK2 humana foi identificada com base em sua atividade de galactoquinase, na verdade é uma GalNAc quinase. Nenhum caso de galactosemia por deficiência de GALK2 foi descrito.

1.3.3. *GALE*

O gene *GALE* está localizado no braço curto do cromossomo 1, em 1p36, com 4 Kb de DNA genômico e cDNA constituído por 1488 pares de base, codificando um polipeptídeo de 348 aminoácidos, que tem massa molecular estimada em 38,2 kDa. O gene está estruturado em 11 exons. A proteína *GALE* humana é muito similar às proteínas homólogas de *E. coli* (51%), do eucarioto unicelular *K. lactis* (53%) e do camundongo (87%) (DAUDE et al 1995).

Poucos casos de galactosemia são atribuídos às mutações no gene *GALE* e apenas 21 mutações foram descritas até o momento (HGMD® 2015 update - www.biobase-international.com/hgmd) (STENSON et al 2009). Supõe-se que mutações na região promotora e alterações de metilação de elementos reguladores possam explicar a expressão tecido específica observada na forma clínica periférica da galactosemia do tipo III, na qual apenas alterações hematológicas são observadas (MACERATESI et al 1998).

1.4. Os defeitos hereditários no metabolismo da galactose

1.4.1. *A galactosemia clássica*

1.4.1.1 *Breve histórico*

Os aspectos clínicos da galactosemia clássica foram descritos inicialmente por von Reuss em 1908 em sua publicação intitulada “excreção de açúcar na infância”. Ele descreveu um lactente com baixo ganho pôndero-

estatural, hepatoesplenomegalia e galactosúria, que parou de eliminar galactose pela urina quando o leite foi retirado da dieta. Este lactente, entretanto, foi a óbito por cirrose hepática possivelmente alcoólica, pois recebia como tratamento chá misturado com conhaque. Embora não foi possível a confirmação do diagnóstico naquela época, tem sido aceito que von Reuss foi o primeiro a relatar um paciente com galactosemia (VON REUSS 1908).

Na década seguinte, Goppert descreveu um lactente com baixo ganho pômdero-estatural, icterícia, e hepatomegalia, que evoluiu com atraso no desenvolvimento neuropsicomotor e tinha excreção urinária de açúcares e albumina. Ele tolerava sucrose, maltose, frutose e glicose a doses de 2 mg/kg, mas apresentava galactosúria dose dependente quando recebia galactose. Foi feita então a exclusão da galactose da dieta e houve uma reversão do quadro clínico. Tinha histórico familiar positivo, com dois irmãos que tinham sinais e sintomas semelhantes e faleceram nas primeiras semanas de vida. Goppert concluiu que seu paciente sofria de uma doença hepática familiar na qual a lactose deveria ser substituída por outros açúcares, como a maltose e sucrose. (GOPPERT 1917)

Em meados da década de 50, Komrower e colaboradores demonstraram pela primeira vez que nesta condição ocorria acúmulo de galactose-1-fosfato em eritrócitos, apontando onde ocorre o bloqueio metabólico (KOMROWER et al 1956). O resultado deste trabalho foi a pista para se determinar a etiologia da galactosemia, sendo que em 1956, Kalckar a definiu enzimaticamente como decorrente da deficiência da GALT (KALCKAR et al 1956).

1.4.1.2. Aspectos clínicos da galactosemia clássica

Clinicamente, a galactosemia clássica se apresenta no período neonatal, após a ingestão de galactose, proveniente da lactose do leite materno. O sintoma inicial mais comum é o baixo-ganho pômdero-estatural, que depois é acompanhado por dificuldade para mamar, vômitos e diarreia. Posteriormente, o recém-nascido pode evoluir com sinais e sintomas de doença hepática, como hepatomegalia, icterícia e coagulopatia. A progressão desta síndrome tóxica neonatal inclui septicemia por *E. coli* na segunda semana de vida, acidose metabólica hiperclorêmica com aminoacidúria e hemorragia vítrea. Catarata

pode ser detectada ao exame com lâmpada de fenda (HOLTON et al 2001; BOSCH 2006) [Tabela 1].

Neurologicamente, estes pacientes podem desenvolver encefalopatia, caracterizada por sinais de hipertensão intracraniana com edema cerebral, geralmente após dias de sinais não específicos, como hipotonia. Nos casos mais graves, se o tratamento não for iniciado precocemente, podem evoluir para letargia, coma, e óbito nas primeiras semanas de vida. O tratamento com dieta sem galactose é muito eficaz no período neonatal e deve ser instituído assim que houver suspeita, pois causa regressão dos sinais e sintomas entre uma a duas semanas.

Alguns pacientes podem desenvolver um quadro clínico de evolução mais crônica, caracterizado por recusa alimentar persistente e vômitos recorrentes, baixo ganho pômbero-estatural e atraso no desenvolvimento neuropsicomotor (HOLTON et al 2001).

Mesmo seguindo a restrição dietética de galactose, frequentemente os pacientes apresentam complicações em longo prazo, como atraso no desenvolvimento neuropsicomotor, dispraxia verbal, anormalidades motoras e hipogonadismo hipergonadotrófico (RIDEL et al 2005; RUBIO-AUGUSTI et al 2013; GUBBELS et al 2013). A causa destas complicações ainda não está bem estabelecida. Foi proposto que poderia estar relacionada à síntese endógena de galactose ou à galactosilação deficiente de glicoproteínas. Gitzelmann e Steinman (1984) formularam a hipótese de autointoxicação, sugerindo que a produção endógena de galactose, a partir do metabolismo de glicoproteínas e glicolipídeos poderiam ter um efeito tóxico, justificando parte destes sintomas. Estudos de *turnover* demonstraram que ocorre diminuição exponencial da produção endógena de galactose com o avanço da idade. (SCHADEWALDT et al 2004; SCHADEWALDT et al 2014).

Tabela 1 - Principais achados clínicos de 270 neonatos sintomáticos com galactosemia (WAGGONER et al 1990).

Achados clínicos	%	Detalhes
Dano hepatocelular	89%	Icterícia (74%) Hepatomegalia (43%) Testes de função hepática alterados (10%) Distúrbios da coagulação (9%) Ascite (4%)
Intolerância alimentar	76%	Vômitos (47%) Diarreia (12%) Recusa alimentar (23%)
Baixo ganho pômdero estatural	29%	
Letargia	16%	
Crises convulsivas	1%	
Sepse	10%	<i>Escherichia coli</i> (26 casos) <i>Klebsiella</i> (3) <i>Enterobacter</i> (2) <i>Staphylococcus</i> (1) <i>Beta-streptococcus</i> (1) <i>Streptococcus faecalis</i> (1)

Waggoner e colaboradores (1990) fizeram um estudo com 350 pacientes com galactosemia e concluíram que a despeito do tempo e aderência ao tratamento dietético, a maioria dos pacientes desenvolve complicações de logo prazo. Aproximadamente metade (45%) dos menores de seis anos apresentava atraso no desenvolvimento neuropsicomotor. Problemas na fala estavam presentes em 56% dos pacientes com pelo menos três anos de idade, sendo que 92% destes tinham atraso no desenvolvimento do vocabulário e 90% problemas na articulação da fala, incluindo dispraxia verbal. Dos pacientes com mais de três anos e meio, 18% tinham problemas motores, como incoordenação, alterações na marcha, tremores finos e ataxia. Em relação à

função gonadal, 81% das pacientes maiores de 15 anos tinham sinais de falência ovariana. Catarata foi observada em 30% dos pacientes.

1.4.1.3. Diagnóstico

O diagnóstico da galactosemia clássica é baseado na demonstração da redução ou ausência da atividade enzimática da GALT, que pode ser feito durante a triagem neonatal ou após suspeita clínica.

A galactosemia clássica deve ser suspeita em todo lactente que apresentar sinais de doença hepática com icterícia, vômitos recorrentes e baixo ganho ponderal.

Na investigação laboratorial inicial é comum a presença de hiperbilirrubinemia combinada ou indireta, elevação das transaminases hepáticas e de aminoácidos, principalmente metionina, fenilalanina e tirosina, alteração nas provas de coagulação, hipoglicemia, disfunção tubular renal (acidose metabólica, galactosúria e glicosúria, fosfatúria, hipofosfatemia, aminoacidúria e albuminúria) e anormalidades hematológicas (anemia hemolítica) (BOSCH 2006; HOLTON et al 2001).

O teste de Benedict, usado há muito tempo para identificar a presença de substâncias redutoras na urina e que geralmente é positivo na galactosemia, têm utilidade limitada, uma vez que a taxa de falso positivo é muito elevada. A presença de agentes redutores na urina ocorre nos erros inatos do metabolismo dos glicídios, mas também pode ser encontrada em recém-nascidos prematuros com imaturidade hepática e com hipoglicemia na primeira semana de vida. (MOREL-GARCIA et al 2014).

A dosagem sérica de galactose total encontra-se elevada na galactosemia clássica, mas este exame não é específico para a forma clássica. Encontra-se também elevado nas outras formas de galactosemia, por deficiência na atividade de outra enzima da via de Leloir [figura 9].

O exame padrão ouro para o diagnóstico da galactosemia clássica é a dosagem da atividade enzimática da galactose-1-fosfato uridiltransferase em eritrócitos (a partir de sangue periférico colhido com heparina ou EDTA) (BOSCH 2006).

Após a caracterização e clonagem do gene *GALT* e com a maior disponibilidade de exames de biologia molecular, começaram a partir de 1991, serem identificadas as mutações responsáveis pela GC. A identificação das mutações não é essencial para o diagnóstico, porém pode trazer informações importantes em relação à evolução clínica.

Figura 9 - Fluxograma sugerido de investigação para um paciente com suspeita de ter um erro inato do metabolismo da galactose (modificado de CUTHBERT et al, 2008).

1.4.1.4. Aspectos genéticos da galactosemia clássica

Apesar da galactosemia clássica ser uma doença autossômica recessiva causada por mutações em um único *locus* (gene *GALT*), existe uma considerável heterogeneidade bioquímica e fenotípica entre os pacientes, tanto entre os que apresentam mutações diferentes quanto os que apresentam a

mesma mutação. Vários estudos foram conduzidos com o objetivo de fazer uma correlação entre genótipo e fenótipo na galactosemia. Mesmo com muita controvérsia na literatura, foi demonstrado que a presença da mutação p.Q188R em estado homoalélico ou em associação com algumas mutações que resultam em atividade indetectável da GALT (p.K285N, p.L195P, em sítio de *splicing*, deleções ou inserções com mudança na matriz de leitura, e mutações *nonsense*), estão associadas a um pior prognóstico, principalmente em relação às complicações tardias neurológicas (RIDEL et al 2005; SHIELD et al 2000; KAUFMAN et al 1994; HUGHES et al 2009; TYFIELD 2000).

A mutação p.Q188R é a mais comum e é a mais frequente em todas as populações caucasianas. Entretanto, existe uma considerável variabilidade na frequência relativa em populações individuais. As maiores frequências da mutação p.Q188R estão na Irlanda (80%) (MURPHY et al 1999) e Grã Bretanha (77%). De forma geral, a mutação p.K285N é muito mais rara, mas em alguns países ao norte na Europa central, é a segunda mutação mais frequente causadora de doença, e corresponde a 25 a 40% das mutações (KOZAK et al 1999; ZEKANOWSKI et al 1999).

A mutação p.S135L é encontrada quase exclusivamente em descendentes de Africanos. Nestes povos corresponde a cerca de 50% dos alelos mutantes e na África do Sul a 91% (LAI et al 1996; MANGA et al 1999), e está associada a um melhor prognóstico que as mutações Europeias. Em relação aos Ameríndios sul americanos, não se conhece a existência de uma mutação específica (NOVELLI et al 2000).

As mutações mais comuns estão associadas a variantes com efeito clínico mais leves e são consideravelmente mais prevalentes que aquelas que levam a forma clínica clássica da galactosemia. A mutação mais frequente no gene *GALT* é a p.N314D, que está associada a duas isoformas da enzima GALT: a variante *Los Angeles* (Duarte 1 ou D1) caracterizada por um aumento na atividade enzimática e a Duarte 2 (D2) caracterizada por uma redução na atividade enzimática. (BERGREN e DONNELL 1973; ELSAS et al 1994).

Embora a mutação p.N314D seja responsável pelo comportamento diferente da variante *Los Angeles* e da Duarte 2 na eletroforese em gel e na focalização isoelétrica, foi demonstrado que ela não é a causa da variação na atividade enzimática observada nestas isoformas. De fato, atribui-se a esta

diferença um fator quantitativo, que deve ser determinado pelas outras mutações que estão em desequilíbrio de ligação com a p.N314D, tanto na variante *Los Angeles* quanto na Duarte 2 (ANDERSEN et al 1984, CARNEY et al 2009).

O alelo D1 carrega a alteração de nucleotídeo c.652C>T, que resulta na substituição silente no códon 218 (CTA>TTA; p.L218L) (LANGLEY et al 1997), enquanto o alelo D2 possui uma deleção de 4 pb na região 5'UTR (C.-119_-116delGTCA) e mais três variações de bases intrônicas [c.378-27G>C ou IVS4nt-27G>C; c.508-24G>A ou IVS5nt-24G>A; e c.507+62G>A ou IVS5nt+62G>A] (TRBUSEK et al 2001).

Indivíduos heterozigotos com um alelo Duarte 2 e outro normal (N/D2) têm em média 75% de atividade da GALT em eritrócitos quando comparado com os indivíduos homozigotos normais (N/N). Os homozigotos Duarte 2 (D2/D2) possuem 50% de atividade e os heterozigotos compostos com um alelo Duarte e outro com uma mutação de galactosemia clássica, possuem cerca de 25% da atividade enzimática esperada. Estes indivíduos são considerados afetados pela condição clínica conhecida por galactosemia Duarte (ELSAS et al 1994).

A mutação p.N314D hoje é considerada um polimorfismo. Carney e colaboradores realizaram um estudo comparativo de sequências baseados no HapMap (catálogo de variantes genéticas comuns que ocorrem na espécie humana) e estimaram a frequência alélica de p.N314D em 11% da população Europeia. A frequência estimada global é de 8%. Eles também analisaram a sequência do gene *GALT* de várias espécies e concluíram que o alelo p.D314 é o alelo ancestral e p.N314 um polimorfismo, predominante em seres humanos modernos e que parece ser exclusivo aos humanos [Figura 10]. De fato, p.D314 não é encontrado com frequência significativa nas populações de ascendência Africana, embora seja encontrado em Afro-americanos, provavelmente devido à miscigenação. Este padrão de distribuição sugere que a variante p.D314N surgiu na África muito cedo na evolução humana, e que a persistência do alelo p.D314 em Europeus, e em menor escala nas populações Asiáticas, pode refletir um efeito fundador (CARNEY et al 2009).

Figura 10 - Origem e relação entre os principais haplótipos *GALT*. Acredita-se que o alelo ancestral seja o L218 (CTA) + D314, uma vez que foi encontrado em outras espécies de homínidos e primatas. A substituição D314N ocorreu cedo na evolução dos humanos modernos e é encontrada com maior frequência nos humanos atualmente (modificado de Carney et al 2009).

A população brasileira é uma das mais heterogêneas do mundo, em consequência de cinco séculos de miscigenação entre três raízes ancestrais: os Ameríndios autóctones, os Europeus e os Africanos subsaarianos. Essa heterogeneidade e miscigenação têm implicações importantes na constituição genética atual da população brasileira (CALLEGARI-JACQUES et al 2003; CARVALHO SILVA et al 2001) e justifica a grande diversidade de mutações no gene *GALT* encontradas neste estudo.

1.4.2. A galactosemia tipo II

A galactosemia tipo II, causada pela deficiência da GALK1, tem como principal característica clínica a catarata juvenil (GITZELMANN et al 1967; HOLTON et al 2001; BOSCH et al 2002). Existem relatos de associação da galactosemia tipo II com outras alterações clínicas, como por exemplo: *pseudotumor cerebri*; hepatoesplenomegalia; hipoglicemia; hipercolesterolemia; crises convulsivas; microcefalia; surdez e déficit cognitivo (BOSCH et al 2002; HENNERMANN et al 2011). Entretanto, a maioria destes relatos é de casos

isolados, sendo difícil estabelecer uma relação causal direta. A exceção se refere ao *pseudotumor cerebri* (hipertensão intracraniana idiopática), que foi descrito mais de uma vez e postula-se que ocorra pelo mesmo mecanismo responsável pela formação da catarata (HUTTENLOCHER et al 1970).

A redução ou ausência da atividade da enzima galactokinase resulta no acúmulo de galactose nas células e no plasma sanguíneo. Este é um problema particular nas células do cristalino dos olhos, onde a enzima aldose redutase converte a galactose no seu correspondente álcool de açúcar galactitol [Figura 4]. Embora a galactose possa ser transportada através da membrana celular, o galactitol não pode, conseqüentemente, ele se acumula nas células do cristalino. Isto conduz à absorção osmótica de água, com conseqüente edema e eventual apoptose e lise celular (KINOSHITA et al 1962; DVORNIK et al 1973; LIN et al 1991). Acredita-se que este efeito seja semelhante ao observado em alguns pacientes diabéticos, nos quais a glicose que se acumula no cristalino é reduzida ao seu correspondente álcool de açúcar sorbitol, resultando em efeitos osmóticos e líticos semelhantes (LEE et al 1995).

A incidência estimada da galactosemia tipo II varia. Thalhammer e colegas (1968) relataram o primeiro caso identificado a partir de um programa de triagem neonatal, após a triagem de 35.770 recém-nascidos. Mayes e Guthrie (1968) determinaram a atividade da GALK em 642 indivíduos, a maioria de ascendência caucasiana e estimaram a incidência de heterozigotos em 1:107. Eles concluíram que a deficiência da galactokinase deve ocorrer em cerca de 1:46.000 nascimentos. Levy (1980), no entanto, encontrou apenas seis recém-nascidos com deficiência galactokinase após a triagem de 6.000.000 crianças para galactosemia (HENNERMANN et al 2011).

A maior parte das mutações descritas no gene *GALK1* são únicas ("Human gene mutation database" - HGMD® 2015 update - www.biobase-international.com/hgmd) (STENSON et al 2009). Apenas quatro mutações podem ser consideradas frequentes em determinadas populações específicas, são elas: p.P28T, p.Q382X, p.A198V e p.R256W. A mutação p.P28T tem sido descrita como uma mutação fundadora na população Romana (KALAYDJIEVA et al 1999), a p.Q382X ocorre frequentemente na Costa Rica, e a p.A198V, denominada "variante Osaka", assim como a p.R256W, são encontradas

quase que exclusivamente na população japonesa e coreana. (KOLOSHA et al 2000; ASADA et al 1999; PARK et al 2007; OKANO et al 2001).

A “variante Osaka” está presente em 4,1% dos japoneses e 2,8% dos coreanos, e com uma baixa incidência em taiwaneses e chineses. É encontrada com uma frequência significativamente mais elevada (7,8%; $p < 0,023$) em japoneses com catarata bilateral. Acredita-se que esta variante surgiu em um antepassado comum a japoneses e coreanos e que seja um fator de risco para catarata em indivíduos idosos (OKANO et al 2001).

O tratamento é o mesmo da galactosemia clássica, consiste na restrição dietética de lactose. Os pacientes que aderem ao tratamento apresentam uma redução nos níveis plasmáticos de galactose e de galactitol, com consequente prevenção e até mesmo regressão da catarata (HOLTON et al 2001; BOSCH et al 2002).

1.4.3. A Galactosemia tipo III

A galactosemia tipo III é a doença mais rara do metabolismo da galactose, com poucos casos publicados na literatura. Existem duas formas da galactosemia tipo III: a periférica, na qual a atividade da GALE está reduzida apenas nas células sanguíneas; e a generalizada, na qual diversos tecidos, como fígado e fibroblastos de pele demonstram redução/ausência de atividade enzimática.

Gitzelmann e colaboradores (1972) foram os primeiros a relatarem a deficiência galactose epimerase em um bebê assintomático que tinha elevação da galactose total em um exame de triagem neonatal. Mitchell *et al* (1975) relataram a deficiência da GALE no sangue periférico de sete pessoas pertencentes a três famílias, nas quais nenhuma anormalidade clínica foi identificada. Estes casos foram considerados como afetados pela forma periférica da doença.

Através de triagem neonatal, Alano e colaboradores (1998) identificaram um paciente com deficiência da GALE de ascendência mista Paquistanesa-Europeia. Ele teve boa evolução clínica no período neonatal, mesmo com uma dieta contendo a lactose. Os estudos bioquímicos, incluindo pesquisa de substâncias redutoras na urina e dosagem de galactitol, eram consistentes com

o diagnóstico de deficiência da GALE. Embora os marcos iniciais do desenvolvimento fossem normais, mais tarde ele apresentou atraso no desenvolvimento da linguagem e na aquisição dos marcos motores.

Holton *et al.* (1981) relataram um bebê paquistanês com uma forma grave de galactosemia devido à deficiência da epimerase. O paciente apresentou no período neonatal sintomas clínicos semelhantes aos da galactosemia clássica, incluindo icterícia, vômitos, hipotonia, baixo ganho pômdero-estatural, hepatomegalia, aminoacidúria moderada e galactosuria acentuada. Sardharwalla *et al.* (1988) também descreveram uma criança muçulmana Asiática com um fenótipo grave. Apesar do diagnóstico e tratamento precoce, com os exames demonstrando bom controle bioquímico, a avaliação clínica com dois anos e nove meses de idade mostrou retardo mental grave e surdez neuro-sensorial profunda. Ambos os pacientes relatados por Holton *et al.* (1981) e Sardharwalla *et al.* (1988) foram tratados com uma dieta com restrição de galactose, que foi bem sucedida no alívio dos sintomas agudos, mas não evitou um subsequente declínio motor e intelectual. A deficiência na atividade da GALE foi encontrada não só nos eritrócitos, mas também em hepatócitos e fibroblastos da pele, sugerindo que o quadro clínico grave está associado a forma generalizada da doença.

2. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho é analisar os aspectos clínicos, bioquímicos e moleculares dos pacientes com quadro clínico e/ou laboratorial sugestivo de galactosemia, que passaram pelos ambulatórios de pediatria ou de erros inatos do metabolismo do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP e de pacientes de outros hospitais do Brasil, com a finalidade de estabelecer uma relação genótipo/fenótipo desta patologia na população brasileira.

Este estudo também visa acrescentar mais evidências científicas para a discussão sobre a introdução da galactosemia no programa de triagem neonatal do Brasil, onde a incidência da doença é estimada em cerca de 1:20.000.

3. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA

Por se tratar de uma doença genética com alta prevalência no Estado de São Paulo (1:19.985) (CAMELO JR et al 2009) em relação a outras regiões do mundo e com um tratamento relativamente simples e barato, pois a única terapia existente consiste na restrição dietética de galactose, torna-se claro a importância de se detectar os indivíduos afetados o mais precocemente possível. Para tanto, é fundamental que os médicos, em especial os pediatras, conheçam os aspectos clínicos da doença assim como os fatores que determinam a variabilidade fenotípica, e um deles é o genótipo.

Provavelmente por ser considerada uma doença rara e com um quadro clínico não muito específico, o diagnóstico da galactosemia no Brasil geralmente é tardio, sendo muitas vezes confundida com sepse neonatal ou isoimunização.

Como muitas crianças sem diagnóstico morrem ou quando o diagnóstico é feito já apresentam sequelas, a doença gera altos custos ao sistema de saúde. Camelo Jr. e colaboradores demonstraram as vantagens na relação custo/benefício da introdução da galactosemia no programa nacional de triagem neonatal (CAMELO JR et al 2009).

Somos da opinião que a eficácia do tratamento só será ótima quando iniciado precocemente e se os fatores de variação individual, como o genótipo, forem conhecidos. Assim, podemos admitir que o prognóstico clínico dependa fundamentalmente das mutações presentes no gene *GALT*, associadas ao nível de exposição à galactose (dietética e endógena), e talvez a presença de outros fatores como genes modificadores ou agentes regulatórios, que podem ser importantes no controle da expressão do gene *GALT*.

Estes fatos demonstram a importância de se conhecer o genótipo e o fenótipo dos pacientes com galactosemia na população brasileira, que é considerada é uma das mais heterogêneas do mundo. Desta forma o presente trabalho pretende cumprir com os seus objetivos, caracterizando as mutações no gene *GALT* dos pacientes avaliados e seus familiares de maior risco e documentando os aspectos clínicos da doença, para reforçar os dados existentes na literatura sobre a relação genótipo/fenótipo.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Pacientes

Entraram no estudo os pacientes com o diagnóstico de galactosemia clássica confirmado por análise bioquímica ou os que apresentaram quadro clínico e laboratorial compatível, porém ainda sem diagnóstico definitivo. Também foram analisados os recém-nascidos que tiveram teste de triagem neonatal expandida positivo para galactosemia. Um total de 31 indivíduos participaram do estudo, sendo que as principais fontes de pacientes foram os ambulatórios de erros inatos do metabolismo e de gastroenterologia infantil do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (HCRP). Foram também incluídos pacientes que vierem referidos de outros serviços e outros hospitais pelo Brasil.

4.2. Aspectos éticos

Este estudo foi realizado de acordo com os princípios éticos universais, seguindo as recomendações estabelecidas pela declaração de Helsinki. Para participar do estudo, foi obtido um termo de consentimento livre e esclarecido de cada paciente ou de seu representante legal. [Apêndice A]. Após consentirem com a realização da pesquisa, foram submetidos à avaliação clínica e coleta das amostras, as quais eram numeradas para garantir o sigilo, e armazenadas num banco de amostras situado no Laboratório de Genética Molecular e Bioinformática da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. As amostras coletadas foram utilizadas somente neste estudo, e no caso de surgirem novas propostas de projetos com outros objetivos, um novo projeto de pesquisa deverá ser redigido, os participantes deverão dar novo consentimento e o projeto novamente submetido à avaliação pelo comitê de ética do HCRP.

4.3. Avaliação clínica

Os dados clínicos dos pacientes foram obtidos a partir de revisão dos prontuários médicos dos pacientes que fazem seguimento no HCRP e a partir

de informações clínicas fornecidas por médicos de outros serviços que tinham pacientes que foram incluídos no estudo, através do preenchimento de um formulário específico [Apêndice B].

4.4. Dosagem da atividade enzimática da GALT

A dosagem da atividade enzimática da GALT em eritrócitos foi feita através de um método fluorométrico enzimático (DAHLQVIST 1971). As leituras da fluorescência a 460 nm foram obtidas com um fluorímetro Hitachi F-2000 (Hitachi, Tóquio, Japão) e para medir a concentração de hemoglobina, as leituras com absorbância a 410 nm foram obtidos com um espectrofotômetro Hitachi U-2001 (Hitachi, Tóquio, Japão). A faixa normal foi definida como 37- 66 mmol/h por gHb.

4.5. Análise molecular

Todos os pacientes que tiveram o diagnóstico bioquímico confirmado através da dosagem enzimática tanto da galactosemia clássica como das variantes foram submetidos à análise molecular do gene *GALT* por sequenciamento de DNA. Os pacientes que apresentavam galactose total elevada e avaliação da *GALT* normal foram submetidos ao sequenciamento do gene *GALK1*, com o objetivo de diagnosticar uma eventual galactosemia devido à deficiência da *GALK1*.

4.5.1 Extração do DNA de leucócitos

A extração do DNA de leucócitos foi feita a partir de amostras de sangue periférico, conforme o protocolo de extração adotado pelo Laboratório de Genética Molecular e Bioinformática (LGMB) do Centro Regional de Hemoterapia de Ribeirão Preto (Super Quik-gene-rapid DNA isolation"- PROMEGA). Após a extração o material foi quantificado no espectrofotômetro "Nanodrop" e armazenado a -20°C até a análise posterior.

4.5.2. Reação em cadeia da polimerase (PCR) – gene *GALT*

Foram desenhados oito pares de *primers* para que todos os éxons do gene *GALT* e regiões intrônicas adjacentes fossem cobertas pelo sequenciamento.

Todos os *primers* foram desenhados a partir da sequência de referência GenBank NM_000155.2 [Tabela 2, Apêndice C], com o auxílio das ferramentas eletrônicas *UCSC In-Silico PCR* (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr?command=start>) e *OligoAnalyser 3.1* (<http://www.idtdna.com/analyzer/applications/oligoanalyzer/>).

Alguns éxons foram amplificados aos pares devido ao seu tamanho reduzido e proximidade entre eles (éxon 2 com o 3, éxon 4 com o 5 e o éxon 8 com o 9).

As reações foram padronizadas com as seguintes condições: 2,5 µM de cada *primer*; 2,5 mM de dNTPs; 2,5µL de tampão 1X(*Biotoools*); 1 U de Taq polimerase (*Biotoools*) e 200 ng de DNA da amostra (volume final de 25µL). A temperatura de anelamento de todas as reações foi padronizada em 60°C e o tamanho dos fragmentos e pode ser observado na Tabela 2.

4.5.3. Reação em cadeia da polimerase (PCR) – gene *GALK1*

As *PCRs* para análise do gene *GALK1* foram padronizadas nas mesmas condições que as reações para o estudo do gene *GALT*. A única diferença foi os *primers* utilizados, que foram desenhados para que todos os éxons do gene *GALK1* e regiões intrônicas adjacentes fossem cobertas pelo sequenciamento [Tabela 3, Apêndice D]. Foram usadas para o desenho dos *primers* as mesmas ferramentas eletrônicas, e a sequência de referência foi a GenBank #NM_000154.1. As condições da *PCR* ficaram: 2,5 µM de cada *primer*; 2,5 mM de dNTPs; 2,5µL de tampão 1X(*Biotoools*); 1 U de Taq polimerase (*Biotoools*) e 200 ng de DNA da amostra (volume final de 25µL); temperatura de anelamento de 60°C. As sequências dos pares de *primers* e o tamanho dos *amplicons* podem ser vistos na Tabela 3.

Tabela 2 - *Primes* usados nas PCRs e tamanho dos *amplicons* do gene *GALT*.

Primer	Sequência do primer	Tamanho do amplicon em pares de base
GALT_EX1_F	TGAAGTAGGATCATCAATGTCGG	413
GALT_EX1_R	GCAGACTGTACGCCTTGTCG	
GALT_EX2_F	AGACCGACAAGGCGTACAGT	471
GALT_EX2_R	TGACCCAGAAGGAGGTTACAC	
GALT_EX3/4_F	GCCTTCCCTACTCCCTTGTA	371
GALT_EX3/4_R	CCCAATGCTGAGTCTCCAAC	
GALT_EX5/6_F	GTTGGAGACTCAGCATTGGG	536
GALT_EX5/6_R	CCACATCATTGGCATATTTCC	
GALT_EX7_F	GTTTCTTGGCTGAGTCTGAGC	440
GALT_EX7_R	CCACTAACCACCCGAGTCTAAG	
GALT_EX8/9_F	GGTGAGAAGACATCAGATCCTG	531
GALT_EX8/9_R	GGCTTGCTCCTTTGAGGTT	
GALT_EX10_F	GTGCTTTCTAATCTCCTGCCAG	432
GALT_EX10_R	CAGTCCCTTCCTGCCAGAG	
GALT_EX11_F	CCTCCTTAATTGCTCCCTGTC	461
GALT_EX11_R	CCTAAACTGGAATGCTGTCA	

Tabela 3 - *Primes* usados nas PCRs e tamanho dos amplicons do gene *GALK1*.

Primer	Sequência do primer	Tamanho do amplicon em pares de base
GALK1_EX1_F	TCATTGGTTCTTCCCGAAGT	615
GALK1_EX1_R	CTTCCAACGTGGGGAACAG	
GALK1_EX2_F	GCAGTGTGATTGGAGAGGCT	355
GALK1_EX2_R	CCTTCCCCACAGTGTATCAGA	
GALK1_EX3_F	GGTTGGTGGCTTCTGACAAT	450
GALK1_EX3_R	CAGCTATTGTGCCCCGAGTCT	
GALK1_EX4/5_F	CTGGAGTGTGATTGAAGCCA	642
GALK1_EX4/5_R	TTGAAGGGACTGGGGAGAG	
GALK1_EX6/7_F	GGCTGCTGACTCCTCTTTCC	276
GALK1_EX6/7_R	GCAGCTCACCTCATAGTCGTCT	
GALK1_EX8_F	CTGTGCCTGGGGTTTATGG	412
GALK1_EX8_R	CCAAGCATACACCCACCTCT	

4.5.4. Sequenciamento dos fragmentos de DNA

Os fragmentos de DNA amplificados pela PCR foram submetidos ao sequenciamento direto em sequenciador capilar *automático Megabace 1000 DNA Sequencing System®* (Molecular Dynamics & Amersham Life Science) no LGMB, utilizando-se o “kit” DYEnamic ET terminator *Sequencing System®*, conforme instruções do fabricante. Os resultados do sequenciamento foram analisados através dos programas *FinchTV versão 1.4.0* (Geospiza inc. 2004-2006) e *Polyphred* (Geospiza inc.) comparando as sequências obtidas com as de referência, do banco de dados GenBank (#NM_000155.2 e #NM_000154.1).

4.6. Análises *In silico*

As análises *in silico* das novas mutações foram realizadas para a predição da patogenicidade destes alelos, baseadas em scores de predição. A maioria das ferramentas usadas com esta finalidade utilizam informações sobre a sequência e estrutura da proteína, junto com as propriedades físico-químicas dos aminoácidos para calcular a probabilidade de patogenicidade que uma determinada substituição de aminoácidos possa ocasionar em variantes desconhecidas. Duas ferramentas de predição de patogenicidade amplamente utilizadas foram usadas para a análise das mutações novas do tipo *missense* encontradas neste estudo: o *SIFT* (KUMAR et al 2009), que classifica as variantes de acordo com operações matemáticas; e o *Polyphen-2* (ADZHUBEI et al 2010), que utiliza métodos Bayesianos.

Para a avaliação da possível criação de sítios de *splicing* alternativo pelas mutações novas em regiões de *splicing*, foi utilizada a ferramenta “*Automated Splice Site And Exon Definition Analyses*” (ASSEDA), um sistema que avalia mudanças na afinidade de sítios de *splicing* provocadas por mutações, baseado em informações de modelos teóricos (<http://splice.uwo.ca/>). Foram feitas simulações não apenas para as mutações novas, mas também para todas as mutações já descritas na literatura que foram identificadas neste estudo. A finalidade desta abordagem é que as mutações já descritas como

patogênicas sirvam como parâmetro de comparação e validação dos resultados das simulações das novas.

4.7. Estudo de ancestralidade de alguns pacientes

Foi realizado um estudo adicional de ancestralidade, através da colaboração do Laboratório de Genética Humana e Médica da Universidade Federal do Pará. Por questões logísticas e operacionais, estas análises foram realizadas apenas para alguns indivíduos. Nesta etapa foi utilizado um painel de 48 marcadores (bialélicos do tipo INDEL- inserção e deleção de pequenos fragmentos de DNA) informativos de ancestralidade, para se determinar a mistura individual interétnica proporcional, em relação às três principais raízes ancestrais: Africanos; Europeus e Ameríndios.

5. RESULTADOS

5.1. Fenótipo e genótipo

Entre os 31 indivíduos estudados haviam dois pares de irmãos. Nove pacientes faziam seguimento no HC-FMRP-USP e os demais vieram de: Porto Alegre (6); Campinas (6); São Paulo (5); Florianópolis (2); Vitória (2) e Rio de Janeiro (1).

A média de idade dos pacientes no momento do diagnóstico foi de três meses e meio, com exceção de uma paciente adulta que tinha 48 anos de idade. Após a revisão dos prontuários e coleta das informações dos formulários que vieram dos outros centros colaboradores, os principais achados clínicos descritos foram: hepatomegalia (18/31); icterícia (17/31); baixo ganho pondero-estatural – BGPE (14/31); vômitos recorrentes (10/31); anemia hemolítica (5/31); e catarata (5/31) [Tabela 4]. A única paciente adulta incluída no estudo tinha apenas insuficiência ovariana primária. Alguns pacientes foram submetidos à análise molecular devido à alteração no teste de triagem neonatal expandida, e a maior parte deles era considerada assintomática quando entraram no estudo.

A dosagem da atividade enzimática da GALT em eritrócitos variou de indetectável a 19,0 $\mu\text{mol/h/gHb}$ para os indivíduos com o diagnóstico molecular confirmado de galactosemia clássica. Os indivíduos com galactosemia Duarte tiveram a dosagem da GALT entre 3,0 e 29,0 $\mu\text{mol/h/gHb}$. Um indivíduo assintomático detectado pela triagem neonatal que tinha dosagem enzimática de 26,0 $\mu\text{mol/h/gHb}$ depois do sequenciamento se mostrou homozigoto para o alelo Duarte. Quatro indivíduos heterozigotos simples tiveram ensaio enzimático dentro da faixa de afetados (7 a 21 $\mu\text{mol/h/gHb}$), sendo que três deles, além da mutação patogênica foi identificado as mutações provavelmente silentes p.I170I, p.T292T+p.H315H e p.S293S [Tabela 5].

Durante a análise das sequencias de DNA foram identificadas 18 mutações patogênicas diferentes no gene GALT [Tabela 5, Tabela 6, Apêndice E, Apêndice G], sendo que as com maior frequência alélica relativa foram a p.Q188R (27%) e a p.S135L (15%) [tabela 6]. O alelo Duarte esteve presente oito vezes, e sete mutações novas foram identificadas neste estudo, são elas: p.M1T(c.2T>C); p.R33S (c.97C>A); p.P73S (c.217C>T); p.N97del

(c.287_289delACA); IVS3+1G>A (c.328+1G>A); IVS4+4A>C (c.377+4A>C); e p.Q169P (c.506A>C) [Figura 11]. Os indivíduos com as mutações novas apresentavam atividade enzimática da GALT reduzida ou indetectável.

Quatro pacientes foram genotipados como homozigotos para a mutação p.Q188R, um indivíduo era heterozigoto simples, portador do alelo p.P325L e três heterozigotos compostos com um alelo com uma mutação causadora de galactosemia clássica junto com um alelo com mutações preditas silentes (p.H132Y/p.T292T+p.H315H, p.R33S/p.S293S e p.I170I/p.Q188R). A maioria dos pacientes foram genotipados como heterozigotos compostos com duas das seguintes mutações: p.M1T; p.R33H; p.P73S; p.N97del; IVS3+1G>A; IVS4+4A>C; p.S135L; p.Q169P; p.F171S; p.G175D; p.Q188R; p.R204X; p.R231H; p.L275Qfs*5; p.K285N; p.N314D; e p.P325L [Tabela 5, Apêndice E].

Um paciente que foi identificado por triagem neonatal expandida por apresentar dosagem de galactose total elevada, tinha tanto a dosagem de atividade da GALT em eritrócitos quanto o sequenciamento do gene *GALT* normais. Foi realizada uma análise subsequente de toda a região codificante do gene *GALK1* e foram identificadas as mutações c.166-5_c.227dup67 e p.R256W [figura 12], confirmando o diagnóstico de galactosemia tipo II.

5.2. Simulações *in silico*

Todas as mutações novas identificadas neste estudo foram consideradas patogênicas pelas simulações do *SIFT* e/ou *PolyPhen-2* [Tabela 7, Apêndice F].

Houve diferenças entre os resultados dos dois instrumentos utilizados para as mutações novas p.M1T e p.P73S. Uma vez que a mutação p.M1T foi encontrada em três pacientes, todos com baixa dosagem na atividade enzimática da GALT em eritrócitos, podemos considera-la como deletéria. Como o *Poliphen-2* usa algoritmos que levam em consideração as mudanças estruturais das proteínas é possível que ele tenha interpretado a mutação como benigna pelo fato da mutação ter ocorrido na primeira metionina, mudando portanto a região de início da tradução pelo ribossomo.

O outro resultado discrepante refere-se à mutação p.P73S, considerada tolerável pelo *SIFT* e provavelmente prejudicial pelo *Poliphen-2*. O indivíduo que carrega esta mutação também tinha um alelo Duarte, apesar da baixa atividade enzimática, ele é assintomático. Portanto, não é possível estabelecer se esta mutação é patogênica ou não, estudos funcionais adicionais são necessários.

Tabela 4 - Dados clínicos e dosagem da atividade da GALT em eritrócitos.

(continua)

<i>Paciente</i>	<i>Idade ao diagnóstico</i>	<i>Hepato-megalia</i>	<i>Icterícia</i>	<i>Vômitos</i>	<i>Baixo ganho ponderal</i>	<i>Catarata</i>	<i>Anemia hemolítica</i>	<i>Falência ovariana</i>	<i>Atividade da GALT (μmol/h/g Hb)</i>
GAL1	2m	+	+	+	+	-	+	-	Indetectável
GAL2	T.N.	-	-	-	-	-	-	-	26,0
GAL3	3m	+	-	-	-	-	-	-	7,0
GAL4	2m	+	-	+	+	-	-	-	Indetectável
GAL5	1½m	+	+	-	+	-	-	-	11,0
GAL6	4½m	+	+	-	-	+	+	-	Indetectável
GAL7*	2m	+	+	-	+	+	-	-	1,5
GAL8@	T.N.	-	-	-	-	-	-	-	47,0
GAL9	2m	+	+	+	+	-	-	-	5,0
GAL10	2m	-	-	-	-	-	-	-	...
GAL11	T.N.	-	-	-	-	-	-	-	3,0
GAL12#	T.N.	-	-	-	-	-	-	-	13,0
GAL13#	T.N.	-	-	-	-	-	-	-	19,0
GAL14	48y	-	-	-	-	-	-	+	21,0
GAL15*	30m	+	-	-	+	-	+	-	1,0
GAL16	T.N.	-	+	-	+	-	+	-	Indetectável
GAL17	1m	+	+	+	+	-	-	-	Indetectável
GAL18	1m	+	+	+	-	+	-	-	Indetectável
GAL19	3m	+	-	+	+	-	-	-	Indetectável
GAL20	T.N.	-	-	-	-	-	-	-	13,0
GAL21	3m	+	+	+	+	-	-	-	12,0
GAL22	1m	+	+	-	-	-	-	-	3,1

Tabela 4 - Dados clínicos e dosagem da atividade da GALT em eritrócitos.

(continuação)

<i>Paciente</i>	<i>Idade ao diagnóstico</i>	<i>Hepato-megalia</i>	<i>Icterícia</i>	<i>Vômitos</i>	<i>Baixo ganho ponderal</i>	<i>Catarata</i>	<i>Anemia hemolítica</i>	<i>Falência ovariana</i>	<i>Atividade da GALT (μmol/h/g Hb)</i>
GAL23	...	-	+	-	-	-	-	-	10,0
GAL24	4m	+	+	-	-	-	-	-	1,5
GAL25	1½m	+	+	+	+	+	+	-	Indetectável
GAL26	T.N.	-	-	-	-	-	-	-	29,0
GAL27	T.N.	-	+	-	+	-	-	-	13,3
GAL28	2m	+	+	-	+	-	-	-	Indetectável
GAL29	T.N.	-	-	-	-	-	-	-	29,8
GAL30	½m	+	+	+	+	-	-	-	Indetectável
GAL31	1m	+	+	+	-	+	-	-	14.5

@ Paciente com triagem neonatal positiva através de dosagem de galactose total. Como a dosagem da atividade da GALT e o sequenciamento foram normais, foi realizado sequenciamento do gene *GALK1* que confirmou o diagnóstico de galactosemia tipo II.

* Irmãos

Irmãos

Tabela 5 - Resultado do sequenciamento do gene *GALT*.

(continua)

Paciente	5'UTR	Éxon1	Éxon2	Éxon3	Éxon4	Éxon5	Éxon6	Éxon7	Éxon8	Éxon9	Éxon10	Éxon11
GAL1	-	-	-	-	-	-	Q188R (homo)	-	-	-	-	-
GAL2	-119_-116del (homo)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N314D (homo)	-
GAL3	-	-	-	-	-	H132Y (het)	-	-	-	T292T (het)	H315H (het)	-
GAL4	-	-	-	-	-	S135L (het)	Q188R (het)	-	-	-	-	-
GAL5	-	-	-	IVS3+1G>A (het)	-	-	Q188R (het)	-	-	-	-	-
GAL6	-	-	-	-	-	S135L (het)	-	-	-	K285N (het)	-	-
GAL7*	-	M1T (het)	-	-	-	S135L (het)	-	-	-	-	-	-
GAL8@	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GAL9	-	-	-	-	-	-	Q188R (homo)	-	-	-	-	-
GAL10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	P325L (het)	-
GAL11	-119_-116del (het)	-	P73S (het)	-	-	-	-	-	-	-	N314D (het)	-
GAL12#	-119_-116del (het)	-	-	-	-	-	-	R204X (het)	-	-	N314D (het)	-
GAL13#	-119_-116del (het)	-	-	-	-	-	-	R204X (het)	-	-	N314D (het)	-
GAL14	-	-	R33S (het)	-	-	-	-	-	-	S293S (het)	-	-
GAL15*	-	M1T (het)	-	-	-	S135L (het)	-	-	-	-	-	-
GAL16	-	-	-	-	-	S135L (het)	G175D (het)	-	-	-	-	-
GAL17	-	-	-	-	-	Q169P (het)	Q188R (het)	-	-	-	-	-

Tabela 5 - Resultado do sequenciamento do gene *GALT*.

(continuação)

Paciente	5'UTR	Éxon1	Éxon2	Éxon3	Éxon4	Éxon5	Éxon6	Éxon7	Éxon8	Éxon9	Éxon10	Éxon11
GAL18	-	-	-	-	-	S135L (het)	Q188R (het)	-	-	-	-	-
GAL19	-	-	-	-	-	S135L (het)	F171S (het) I170I	-	-	T292T (het)	H315H (het)	-
GAL20	-	-	-	-	-	-	(het)/Q188 R (het)	-	-	-	-	-
GAL21	-	-	R33H (het)	-	-	S135L (het)	-	-	-	-	-	-
GAL22	-	-	-	-	-	-	Q188R (homo)	-	-	-	-	-
GAL23	-119_-116del (het)	-	-	-	-	-	G175D (het)	-	-	-	N314D (het)	-
GAL24	-	-	-	-	-	-	Q188R (homo)	-	-	-	-	-
GAL25	-	-	-	-	IVS4+4 A>C(het)	-	-	-	R231H (het)	-	-	-
GAL26	-119_-116del (het)	-	-	-	-	-	Q188R (het)	-	-	-	N314D (het)	-
GAL27	-	-	-	-	IVS4+4 A>C(het)	-	Q188R (het)	-	-	-	-	-
GAL28	-	-	-	-	-	S135L (het)	-	-	-	L275Qfs* 5 (het)	-	-
GAL29	-119_-116del (het)	-	-	N97del (het)	-	-	-	-	-	-	N314D (het)	-
GAL30	-	M1T (het)	-	-	-	-	Q188R (het)	-	-	-	-	-
GAL31	-	-	-	-	-	-	Q188R (het)	-	-	K285N (het)	-	-

@ sequenciamento do gene *GALK1*: c.166-5_c.227dup67 e c.766C>T (p.R256W)

* Irmãos, # Irmãos

Mutações novas em negrito

Tabela 6 – Detalhes das mutações encontradas.

Região	Troca de nucleotídeos	Tipo de mutação	Troca de aminiácido	Predição pelo SIFT	Predição pelo Polyphen-2	Classificação@	Frequência alélica relativa	Referencias
5'UTR	-119_-116delCAGT*	deleção	-	-	-	benigna (Duarte 2)	0,13	Berry GT et al., 2001
éxon 1	c.2T>C	<i>missense</i>	M1T	deletéria	tolerável	patogênica	0,05	nova
éxon 2	c.97C>A	<i>missense</i>	R33S	deletéria	deletéria	patogênica	0,02	nova
éxon 2	c.98G>A	<i>missense</i>	R33H	deletéria	deletéria	patogênica	0,02	Gort L et al., 2006
éxon 2	c.217C>T	<i>missense</i>	P73S	tolerável	deletéria	predita patogênica	0,02	nova
éxon 3	c.287_289delACA	deleção	N97del	-	-	Patogênica	0,02	nova
intron 3	c.328+1G>A	afeta <i>splicing</i> #	-	-	-	predita patogênica	0,02	nova
intron 4	c.377+4A>C	afeta <i>splicing</i> #	-	-	-	predita patogênica	0,03	nova
éxon 5	c.394C>T	<i>missense</i>	H132Y	deletéria	deletéria	patogênica	0,02	Elsas LJ et al., 1998
éxon 5	c.404C>T	<i>missense</i>	S135L	deletéria	deletéria	patogênica	0,15	Reichardt JK et al., 1992
éxon 5	c.506A>C	<i>missense</i>	Q169P	deletéria	deletéria	patogênica	0,02	nova
intron 5	c.508-24G>A*	polimorfismo	-	-	-	benigna	0,13	Kozak L et al., 2000
intron 5	c.507+62G>A*	polimorfismo	-	-	-	benigna	0,13	Kozak L et al., 2000
éxon 6	c.510C>A	silente	I170I	tolerável	tolerável	benigna	0,02	Item C et al., 2002
éxon 6	c.512T>C	<i>missense</i>	F171S	deletéria	deletéria	patogênica	0,02	Reichardt JK et al., 1992
éxon 6	c.524G>A	<i>missense</i>	G175D	deletéria	deletéria	patogênica	0,03	Gort L et al., 2006
éxon 6	c.563A>G	<i>missense</i>	Q188R	deletéria	deletéria	patogênica	0,27	Reichardt JK et al., 1992
éxon 7	c.610C>T	<i>nonsense</i>	R204X	-	-	patogênica	0,03	Tyfield L et al., 1999
éxon 8	c.692G>A	<i>missense</i>	R231H	deletéria	deletéria	patogênica	0,02	Ashino J et al., 1995
éxon 9	c.824delT	deleção	L275Qfs*5	-	-	patogênica	0,02	Elsas LJ et al., 1998
éxon 9	c.855G>T	<i>missense</i>	K285N	deletéria	deletéria	patogênica	0,03	Leslie ND et al., 1992
éxon 9	c.876G>A	silente	T292T	tolerável	tolerável	Benigna	0,03	Calderon FR et al., 2007
éxon 9	c.879C>T	silente	S293S	tolerável	tolerável	Benigna	0,02	Calderon FR et al., 2007
éxon 10	c.940A>G*	<i>missense</i>	N314D	tolerável	tolerável	benigna (Duarte 1 e 2)	0,13	Reichardt JK et al., 1991
éxon 10	c.945T>C	silente	H315H	tolerável	tolerável	benigna	0,03	Lai K et al., 1996
éxon 10	c.974C>T	<i>missense</i>	P325L	deletéria	deletéria	patogênica	0,02	Greber-Platzer S et al., 1997

* Estas mutações estão em *cis* no alelo Duarte 2

predição pelo ASSEDA

Mutações novas em negrito

Figura 11 - Cromatograma das mutações novas no gene *GALT* identificadas neste estudo: p.M1T, transição heterozigótica de T para C em c.2 no éxon 1; IVS3+1G>A, transição heterozigótica G para A em c.328+1 no intron 3; p.R33S, transversão heterozigótica C para A em c.97 no éxon 2; IVS4+4A>C, transversão heterozigótica A para C em c.377+4 no intron 4; p.P73S, transição heterozigótica C para T em c.117 no éxon 2; p.Q169P, transversão heterozigótica A para C em c.506 no éxon 5.

Figura 12 - Cromatograma das mutações identificadas no gene *GALK1* do paciente com galactosemia tipo II: duplicação heterozigótica de 67 pares de bases de c.166-5 a c.227, que se estende do intron 1 ao éxon 2; e a mutação p.R256W, uma transição heterozigótica de C para T em c.766 no éxon 5.

5.3. Dados de estudo de ancestralidade

Foi possível realizar o estudo de ancestralidade para nove indivíduos, sendo eles o paciente com a mutação nova IVS3+1G>A/p.Q188R e seus pais, dois pacientes homozigotos para a mutação p.Q188R, o paciente com a mutação nova p.M1T/p.S135L, o paciente heterozigoto composto p.S135L/p.K285N, o heterozigoto p.H132Y/p.T292T+p.H315H e o indivíduo homozigoto para o alelo Duarte 2. As proporções de marcadores das raízes ancestrais analisadas nestes indivíduos foram consistente com a origem geografia presumida baseada na literatura, das mutações conhecidas. Os pacientes com as mutações novas apresentaram maior proporção de marcadores de origem Africana [figura 13].

Figura 13 – Proporção de marcadores polimórficos bialélicos do tipo *INDEL* característicos de três grupos de populações ancestrais (Europeu, Africano e Ameríndio) em alguns pacientes deste estudo.

6. DISCUSSÃO

Tem sido comum a publicação do perfil de mutações de diversas doenças genéticas em várias partes do mundo, o que permite uma melhor compreensão sobre a origem e distribuição das mutações, como também a análise do efeito de uma determinada mutação sobre o fenótipo. No caso da galactosemia, existem publicado na literatura médica, painéis com as principais mutações encontradas nos pacientes de diversos países, como por exemplo: França; Espanha; Portugal; Irlanda; Filipinas; Turquia; e Coreia do sul. (COSS et al 2013; BOUTRON et al 2012; GORT et al 2006; GORT et al 2009; ESTRADA et al 2013, ÖZGÜL et al 2013; CHOI et al 2014). Estes estudos mostram que a maioria das mutações são raras, com algumas poucas sendo observadas em diferentes regiões geográficas ou grupos étnicos.

Este trabalho é o primeiro a catalogar as mutações presentes no pacientes brasileiros com galactosemia, provenientes de algumas regiões específicas do Brasil. Pelo fato de não ter sido incluído pacientes de todos os estados, pode ser que a coorte de pacientes analisados não seja representativa da realidade de todo o Brasil, mas os resultados demonstram pelo menos a realidade de alguns dos principais centros de referência em doenças metabólicas do país.

Foram analisados 31 pacientes e os resultados revelaram 26 mutações diferentes no gene *GALT* e duas no gene *GALK1*, com uma média de detecção de alelos patogênicos de 93%. A mutação p.Q188R foi a mais prevalente (27%), seguida da S135L (15%) e do alelo Duarte 2 (13%). A mutação p.M1T foi identificada em três pacientes, incluindo um par de irmãos. Cada uma das mutações IVS4+4A>C, p.G175D e p.R204X foram identificadas em dois pacientes, sendo que a p.R204X também estava presente em um par de irmãos. As mutações p.M1T, p.R33S, p.P73S, p.N97del, IVS3+1G>A, IVS4+4A>C e p.Q169P identificadas neste estudo nunca tinham sido descritas antes.

Em relação ao fenótipo, foi observado um amplo espectro clínico, variando desde um fenótipo com deterioração clínica rapidamente progressiva com falência hepática resultando em óbito no terceiro mês de vida, até formas lentamente progressivas oligossintomáticas. Para os pacientes que receberam o diagnóstico após uma suspeita clínica, foi possível fazer uma análise da correlação genótipo-fenótipo.

Os indivíduos homozigotos para a mutação p.Q188R apresentavam um fenótipo mais grave, assim como o paciente com atividade enzimática da GALT indetectável que é heterozigoto composto para a mutação p.Q188R e a mutação nova p.Q169P. Ambas as mutações estão localizadas num domínio altamente conservado do éxon 6 (LESLIE et al 1992; LAI et al 1999).

A mutação p.Q188R, resultado da transição de nucleotídeos A>G na posição c.563 no éxon 6 é a mais comum, sendo encontrada em aproximadamente 63% dos alelos mutantes (ELSAS et al. 1995; TYFIELD et al. 1999). Sua incidência é maior em populações europeias ou naquelas de origem predominantemente europeia (TYFIELD et al 2000). Esta mutação ocorre em um domínio altamente conservado entre as espécies e muito próximo ao sítio catalítico da enzima. Postula-se que a ponte de hidrogênio habitual entre a glutamina e histidina no sítio ativo da enzima seja comprometida pela substituição da arginina por glutamina, desestabilizando o complexo UMP-GALT. Isto prejudicaria o estágio seguinte da reação da GALT no qual Gal-1-P desloca UDP-Gal do complexo uridil. (GEEGANAGE e FREY 1998; LAI et al 1999).

Indivíduos homozigotos para o alelo p.Q188R geralmente apresentam um quadro clínico grave e atividade enzimática muito baixa ou indetectável, como também é observado em sistemas de expressão *in vitro* (REICHARDT et al 1991; COELHO et al 2014).

A paciente heterozigota composta para as mutações p.Q188R e IVS3+1G>A também apresentou uma evolução clínica desfavorável, progredindo para cirrose hepática antes de iniciar o tratamento dietético. Ela tinha história de uma irmã que foi a óbito por falência hepática de causa desconhecida quando tinha dois meses de idade. Postulamos que a mudança de base de G para A, que ocorre no sítio doador de *splicing* 5'-GU do Intron 3 faça com que o local se torne irreconhecível pelas enzimas de *splicing*, provocando uma consequente excisão do éxon 3 no mRNA, com consequente produção de uma proteína truncada. É exatamente o que acontece, por exemplo, com a mutação comum que causa fenilcetonúria IVS12+1G>A, que faz com que o 12º éxon seja eliminado quando o mRNA está sendo processado (MARVIT et al 1987).

O probando com as mutações p.M1T e p.S135L, com dois meses de idade, apresentava anemia, hepatomegalia, catarata bilateral e ascite. Ele evoluiu com falência hepática, desidratação e encefalopatia hepática. Recebeu o diagnóstico de galactosemia clássica, mas estava tão grave que faleceu por choque séptico logo após iniciar o tratamento dietético. Seu irmão, que nasceu um ano depois, foi diagnosticado logo na segunda semana de vida e, portanto iniciou o tratamento precocemente. Atualmente ele está com cinco anos e apresenta uma boa evolução clínica. Apresenta apenas um pequeno aumento do volume hepático e catarata nuclear bilateral leve, que podem ser atribuídos a uma aderência incompleta à dieta de restrição de lactose. A mutação p.M1T também foi encontrada em heterozigose composta com a mutação p.Q188R em um paciente com o fenótipo grave clássico, que foi diagnosticado logo após o nascimento.

A mutação p.M1T deve ser considerada uma mutação grave, pois afeta o códon de iniciação, o que provocaria a utilização fora da matriz de leitura da próxima trinca AUG, que está localizada 112 nucleotídeos abaixo; por conseguinte, espera-se que produza uma proteína não funcional instável. Assim, o fato de ter sido considerada benigna pelo *polyphen-2*, embora patogênica pelo *SIFT*, pode ser porque o primeiro usa algoritmos que leva em consideração as mudanças estruturais que a mutação provoca na proteína e não leva em conta o fato de que a proteína é truncada.

Os demais pacientes que tinham uma mutação p.S135L apresentavam um quadro clínico intermediário, consistente com o que é descrito na literatura e caracterizado principalmente por recusa alimentar e icterícia, que melhoraram após o início da dieta com restrição de lactose. O alelo p.L135 é encontrado quase que exclusivamente em indivíduos de descendência Africana e os pacientes que apresentam esta mutação têm atividade enzimática residual da GALT em alguns tecidos, além de um fenótipo menos grave. (LAI et al 1996; MANGA et al 1999).

O único paciente adulto incluído neste estudo foi uma mulher de 48 anos de idade, que tinha insuficiência ovariana primária, leve ataxia, e uma atividade residual moderada da GALT (21 $\mu\text{mol/h/gHb}$). Ela não tinha qualquer outro sintoma e após a genotipagem, apenas a mutação nova do tipo *missense* p.R33S e a mutação silente p.S293S foram detectadas. A mutação p.S293S foi

catalogada no banco de dados de mutações da GALT na ARUP (http://www.arup.utah.edu/database/galactosemia/GALT_display.php) por Calderon, que a identificou em heterozigose em um menino afro-americano que apresentou teste de triagem neonatal positivo para galactosemia. Nenhuma mutação patogênica foi encontrada durante o sequenciamento (CALDERON et al 2010).

Substituições de nucleotídeos únicos que estão localizados dentro de um éxon, mas que não alteram o aminoácido codificado (mutações silentes ou sinônimas) são habitualmente consideradas não patogênicas. Existem, no entanto, pelo menos dois mecanismos atualmente reconhecidos, pelos quais tais alterações de nucleotídeos podem de fato ter efeito danoso.

O primeiro é a situação na qual o nucleotídeo que é modificado reside dentro de uma sequência curta particular, que auxilia no processo de *splicing* do mRNA. Estas sequências podem estar dentro dos éxons e são conhecidas como *Exon Splice Enhancer* (ESE). As mutações que estão localizadas numa ESE podem não alterar a sequência de aminoácido, mas podem resultar em alteração do *splicing*, com a inclusão de um intron ou exclusão de um éxon (CÁCERES E HURST 2013).

Um segundo mecanismo foi descrito por Zhang e colaboradores em 2010. Eles investigaram diferentes genes da actina e encontraram pequenas diferenças na sequência de nucleotídeos entre os genes da beta e gama actina, que não alteram a sequência de aminoácidos, mas resulta em consequências funcionais importantes. Especificamente, eles descobriram que a sequência de nucleotídeos diferente, resultando na utilização de códons e, portanto RNA transportadores diferentes, reduziu a taxa de produção da proteína. Isto, por sua vez, reduziu a taxa de dobramento da proteína e, como resultado, o tempo para a ubiquitinação (de um aminoácido lisina interno), provocando assim a degradação acelerada da proteína nos proteossomas. Assim, a substituição de nucleotídeos, embora não afete a estrutura primária da proteína (sequência de aminoácidos) tem um efeito na velocidade de tradução e, conseqüentemente, na sua modificação pós-tradução e estabilidade (ZHANG et al 2010).

Dois pacientes de regiões geográficas diferentes (Porto Alegre-RS e Campinas-SP) e sem qualquer relação de parentesco, tinham a mutação nova

IVS4+4A>C, classificada como patogênica pelo *ASSEDA*. Um era heterozigoto composto com a mutação p.Q188R e outro com a p.R231H. Ambos apresentaram um bom curso clínico, o primeiro foi diagnosticado através do teste de triagem neonatal expandido, portanto iniciou o tratamento precocemente, e o segundo tinha icterícia e hepatomegalia, reconhecidas com 15 dias de vida. Recebeu o diagnóstico com dois meses de idade, já apresentando nesta época catarata bilateral. A mutação p.R231H foi descrita pela primeira vez em um paciente japonês, e um estudo com sistema de expressão usando células COS demonstrou redução de 15% na atividade da GALT comparada com controle (ASHINO et al 1995). Outro estudo de expressão, mas desta vez com células de *E. coli* B21, demonstrou atividade da GALT indetectável para a variante p.R231H (COELHO et al 2014), o que também foi observado na dosagem da GALT em eritrócitos deste paciente com o genótipo IVS4+4A>C/p.R231H.

A variante mais comum da GALT é a produzida pelo alelo Duarte (D2), e geralmente não está associada a um fenótipo clínico quando em homozigose. Quando em heterozigose composta com um alelo que contenha uma mutação causadora de galactosemia clássica, provoca a galactosemia Duarte, uma forma clínica mais branda da doença (ELSAS et al 1994). Neste estudo, oito alelos Duarte foram identificados (13%). Todos os indivíduos com galactosemia Duarte, exceto um, foram diagnosticados através do teste de triagem neonatal expandido, incluindo os heterozigotos compostos D2/p.P73S e D2/p.N97del.

A mutação nova p.P73S foi considerada tolerável pelo *SIFT* e provavelmente prejudicial pelo *Poliphen-2*. Este indivíduo era assintomático, mesmo sem seguir restrição dietética de galactose. Portanto, apesar da baixa atividade enzimática, não é possível determinar se esta nova mutação é patogênica ou não, estudos funcionais adicionais são necessários.

O único paciente com galactosemia Duarte que foi diagnosticado após uma suspeita clínica, é heterozigoto composto D2/p.G175D e tinha apenas icterícia neonatal prolongada. Este paciente tem um ensaio enzimático abaixo do normal (10 $\mu\text{mol/h/gHb}$) e está em uma dieta de restrição de galactose. O indivíduo homozigoto para o alelo Duarte 2 teve um teste de triagem neonatal positivo para galactosemia e tinha atividade enzimática próxima do

limite inferior da normalidade. Foi considerado assintomático no momento da avaliação e não foi indicada a restrição dietética.

O paciente com o diagnóstico de galactosemia tipo II também foi identificado através do teste de triagem neonatal expandido. Apresentou galactose total elevada (610mg/dl com cinco dias de vida, referência < 10mg/dl), dosagem da atividade da GALT em eritrócitos normal, assim como o sequenciamento do gene *GALT*. No sequenciamento do gene *GALK1* foram identificadas as mutações c.166-5_c.227dup67 e p.R256W. A mutação c.166-5_c.227dup67 é uma duplicação/inserção de 67 pares de bases, que inclui cinco pares de base do intron 2 e 62 pares de base do éxon 2 [Figura 14]. Esta duplicação, contém um sítio doador de *splicing* adicional no éxon 2. Se o sítio novo de *splicing* introduzido pela inserção fosse utilizado (o segundo), a região 5' do éxon 2 introduzida seria removida pelo processo de *splicing* como se fizesse parte do intron e não haveria alteração no mRNA. Por outro lado, se o primeiro sítio for utilizado, haveria duplicação de parte do éxon 2 mais as cinco bases do intron no mRNA. Para testar esta hipótese, Kolosha e colaboradores, que descreveram esta mutação pela primeira vez, realizaram RT-PCR do RNA do paciente que era homozigoto para esta mutação e sequenciaram o cDNA obtido. Eles identificaram a presença dos 67 pares de bases extras, indicando que o sítio aceptor de *splicing* proximal é o preferencial, justificando a patogenicidade da mutação. Eles também detectaram uma pequena quantidade de transcrito de tamanho normal na eletroforese em gel de agarose, indicando que ocorre também um pouco de *splicing* correto (KOLOSHA et al 2000).

A mutação p.R256W foi publicada pela primeira vez em um paciente japonês e depois em pacientes coreanos. Em ambos os trabalhos foram realizados estudos de expressão usando células COS, que indicaram atividade enzimática da *GALK1* indetectável para esta mutação. (ASADA et al 1999; PARK et al 2007). Interessantemente, esta mutação não é encontrada em caucasianos, e o paciente com galactosemia tipo II do presente estudo é descendente de europeus (Portugal e Eslovênia).

```

56                               A L E L M T V L V
2581 gaagcctcacgtactgcttgtctctcctgccagGCTCTGGAGCTCATGACGGTGCTGGTG
65 G S P R K D G L V S L L T T S E G A D E
2641 GGCAGCCCCGCAAGGATGGGCTGGTGTCTCTCCTCACCACCTCTGAGGGTGCCGATGAG
85 P Q R L Q F P L P T A Q R S L E P G T P
2701 CCCAGCGGCTGCAGTTTCCACTGCCCACAGCCCAGCGCTCGCTGGAGCCTGGGACTCCT
105 R W A N Y V K G V I Q Y Y P A
2761 CGGTGGGCCAACTATGTCAAGGGAGTGATTGAGTACTACCCAGgtatggggcccaggcct
2821 gagccaagtcctcactgatactaggagtgccacctcacagccacagagcccattcatttg

2581 gaagcctcacgtactgcttgtctctcctgccagGCTCTGGAGCTCATGACGGTGCTGGTG
2641 GGCAGCCCCGCAAGGATGGGCTGGTGTCTCTCCT[gccagGCTCTGGAGCTCATGACGGT
CCTGGTGGGCAGCCCCGCAAGGATGGGCTGGTGTCTCTCCT]CACCACCTCTGAGGGTGC
CGATGAGCCCCAGCGGCTGCAGTTTCCACTGCCCACAGCCCAGCGCTCGCTGGAGCCTGG
GACTCCTCGGTGGGCCAACTATGTCAAGGGAGTGATTGAGTACTACCCAGgtatggggcc
caggcctgagccaagtcctcactgatactaggagtgccacctcacagccacagagcccattcatttg

```

Figura 14 - Acima sequencia normal do éxon 2 e de parte dos introns adjacentes do gene GALK1. Abaixo como ficaria a sequencia com a mutação tipo duplicação/inserção c.166-5_c.227dup67 identificada no paciente com galactosemia tipo II (destacado em azul a sequência duplicada).

Os dados obtidos a partir do estudo de ancestralidade foram consistentes com o esperado, uma vez que indivíduos que apresentavam mutações já descritas como de origem Europeia, tinham maior proporção de marcadores desta população. O mesmo vale para a mutação p.S135L, presente em indivíduos com alta proporção de marcadores Africanos. Nos pacientes com as mutações novas, também houve maior contribuição de marcadores de origem Africana. Este achado indica que a origem destas mutações pode ter ocorrido nesta população, apesar de não ser possível confirmar este achado apenas com os resultados obtidos com esta metodologia. Um estudo adicional de haplótipos ligados ao gene *GALT* poderia fornecer informações mais precisas sobre a origem destas mutações.

A heterogeneidade genética documentada até a presente data, sem dúvida, contribui para a heterogeneidade fenotípica que é observada na galactosemia. Efeitos adicionais de variação não-alélicas e outros fatores constitucionais sobre a variabilidade fenotípica ainda devem ser elucidados. O presente estudo caracterizou o perfil genotípico e fenotípico de alguns pacientes com galactosemia clássica na população brasileira, que é considerada uma das mais heterogêneas do mundo, como um resultado de

mais de cinco séculos de miscigenação entre as três principais raízes ancestrais: os ameríndios, europeus e africanos subsaarianos. A heterogeneidade e miscigenação têm implicações importantes na constituição genética atual da população brasileira (CARVALHO-SILVA et al 2001; CALLEGARI-JACQUES et al 2003), que têm uma elevada prevalência estimada de CG em comparação com outras populações (CAMELO JR et al 2009).

7. CONCLUSÕES

- Este é o primeiro estudo de genotipagem de pacientes brasileiros com diagnóstico de galactosemia.
- Quando um indivíduo recebe o diagnóstico de qualquer uma das formas de galactosemia, seus futuros irmãos devem ser testados para a doença logo após o nascimento. É evidente que o resultado do tratamento dietético é melhor quanto mais precocemente for introduzido.
- A dosagem da galactose total sérica é um ótimo exame para a triagem em grande escala de possíveis recém-nascidos com galactosemia. Entretanto, devido à existência de diferentes tipos de galactosemia e de variantes genéticas benignas, deve-se sempre confirmar o diagnóstico com ensaios enzimáticos específicos, como a dosagem da atividade enzimática da GALT em eritrócitos, e se possível, realizar pesquisa de mutações.
- Qualquer indivíduo que tenha galactose total elevada e dosagem da atividade enzimática da GALT normal deve ser investigado para a galactosemia tipo II(GALK1) e galactosemia tipo III(GALE).
- Existe grande heterogeneidade genética entre os pacientes brasileiros com galactosemia clássica, mas as mutações mais comuns descritas em indivíduos europeus e africanos, p.Q188R e p. S135L respectivamente, também foram as identificadas em maior número de alelos no presente estudo.
- Foram identificadas sete mutações novas neste estudo: p.M1T(c.2T>C); p.R33S (c.97C>A); p.P73S (c.217C>T); p.N97del (c.287_289delACA); IVS3+1G>A (c.328+1G>A); IVS4+4A>C (c.377+4A>C); e p.Q169P (c.506A>C). Pode-se concluir que grande maioria delas são definitivamente patogênicas, uma vez que foram identificadas em indivíduos com indícios clínicos de galactosemia e dosagem enzimática baixa e/ou ausente. Além disso, as simulações de patogenicidade *in silico* consideraram pelo menos uma vez, todas elas como possivelmente danosas.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abraham HD, Howell RR. Human hepatic uridine diphosphate galactose pyrophosphorylase. Its characterization and activity during development. *J Biol Chem* 1969; 244(4):545-50.

Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, et al. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods* 2010; 7(4):248-249.

Alano A, Almashanu S, Chinsky JM, Costeas P, Blitzler MG, Wulfsberg EA, et al. Molecular characterization of a unique patient with epimerase-deficiency galactosaemia. *J Inherit Metab Dis* 1998; 21(4):341-50.

Andersen MW, Williams VP, Sparkes MC, Sparkes RS. Transferase-deficiency galactosemia: immunochemical studies of the Duarte and Los Angeles variants. *Hum Genet* 1984; 65(3):287-90.

Asada M, Okano Y, Imamura T, Suyama I, Hase Y, Isshiki G. Molecular characterization of galactokinase deficiency in Japanese patients. *J Hum Genet* 1999; 44(6):377-382.

Ashino J, Okano Y, Suyama I, Yamazaki T, Yoshino M, Furuyama J, et al. Molecular characterization of galactosemia (type 1) mutations in Japanese. *Hum Mutat* 1995; 6(1):36-43.

Bergren WG, Donnell GN. A new variant of galactose-1-phosphate uridylyltransferase in man: the Los Angeles variant. *Ann Hum Genet* 1973; 37(1):1-8.

Berry GT, Leslie N, Reynolds R, Yager CT, Segal S. Evidence for alternate galactose oxidation in a patient with deletion of the galactose-1-phosphate uridylyltransferase gene. *Mol Genet Metab* 2001; 72(4):316-21.

Berry GT, Nissim I, Lin Z, Mazur AT, Gibson JB, Segal S. Endogenous synthesis of galactose in normal men and patients with hereditary galactosaemia. *Lancet* 1995; 346(8982):1073-4.

Berry GT, Palmieri M, Gross KC, Acosta PB, Henstenburg JA, Mazur A, et al. The effect of dietary fruits and vegetables on urinary galactitol excretion in galactose-1-phosphate uridylyltransferase deficiency. *J Inherit Metab Dis* 1993; 16(1):91-100.

Bosch AM. Classical galactosaemia revisited. *J Inherit Metab Dis* 2006; 29(4):516-25.

Bosch AM, Bakker HD, van Gennip AH, van Kempen JV, Wanders RJ, Wijburg FA. Clinical features of galactokinase deficiency: a review of the literature. *J Inherit Metab Dis* 2002; 25(8):629-34.

Boutron A, Marabotti A, Facchiano A, Cheillan D, Zater M, Oliveira C, et al. Mutation spectrum in the French cohort of galactosemic patients and structural simulation of 27 novel missense variations. *Mol Genet Metab* 2012; 107(3):438-47.

Cáceres EF, Hurst LD. The evolution, impact and properties of exonic splice enhancers. *Genome Biol* 2013; 14(12):R143.

Calderon FR, Phansalkar AR, Crockett DK, Miller M, Mao R. Mutation database for the galactose-1-phosphate uridylyltransferase (GALT) gene. *Hum Mutat* 2007; 28(10):939-43 (acesso em 01/2015 http://www.arup.utah.edu/database/galactosemia/GALT_display.php).

Callegari-Jacques SM, Grattapaglia D, Salzano FM, Salamoni SP, Crossetti SG, Ferreira ME, et al. Historical genetics: spatiotemporal analysis of the formation of the Brazilian population. *Am J Hum Biol* 2003; 15(6):824-34.

Camelo Jr JS, Fernandes MI, Maciel LM, Scrideli CA, Santos JL, Camargo Jr AS, et al. Galactosaemia in a Brazilian population: High incidence and cost-benefit analysis. *J Inherit Metab Dis* 2009; 32 Suppl 1:S141-9.

Carvalho-Silva DR, Santos FR, Rocha J, Pena SD. The phylogeography of Brazilian Y-chromosome lineages. *Am J Hum Gen* 2001; 68(1):281-6.

Carney AE, Sanders RD, Garza KR, McGaha LA, Bean LJH, Coffee BW, et al. Origins, distribution and expression of the Duarte-2 (D2) allele of galactose-1-phosphate uridylyltransferase. *Hum Mol Genet* 2009; 18(9):1624-32.

Choi R, Jo KI, Ko DH, Lee DH, Song J, Jin DK, et al. Novel GALT variations and mutation spectrum in the Korean population with decreased galactose-1-phosphate uridylyltransferase activity. *BMC Med Genet* 2014 Aug 15;15:94.

Coelho AI, Trabuco M, Ramos R, Silva MJ, Tavares de Almeida I, Leandro P, et al. Functional and structural impact of the most prevalent missense mutations in classic galactosemia. *Mol Genet Genomic Med* 2014; 2(6):484-96.

Coss KP, Doran PP, Owoeye C, Codd MB, Hamid N, Mayne PD, et al. Classical Galactosaemia in Ireland: incidence, complications and outcomes of treatment. *J Inherit Metab Dis* 2013;36(1):21-7.

Cuatrecasas P, Segal S. Galactose conversion to D-xylulose: an alternate route of galactose metabolism. *Science* 1966; 153(3735):549-51.

Cuthbert C, Klapper H, Elsas L. Diagnosis of inherited disorders of galactose metabolism. *Curr Protoc Hum Genet* 2008; Chapter 17:Unit 17.5.

Dahlqvist A. A fluorometric method for the assay of galactose-1-phosphate in red blood cells. *J Lab Clin Med* 1971; 78:931–938.

Daude N, Gallaher TK, Zeschnigk M, Starzinski-Powitz A, Petry KG, Haworth IS, et al. Molecular cloning, characterization, and mapping of a full-length cDNA encoding human UDP-galactose 4'-epimerase. *Biochem Mol Med* 1995; 56(1):1-7.

Dvornik E, Simard-Duquesne N, Krami M, Sestanji K, Gabbay KH, Kinoshita JH, et al. Polyol accumulation in galactosemic and diabetic rats: control by an aldose reductase inhibitor. *Science* 1973; 182(4117):1146-8.

Elsas LJ, Dembure PP, Langley S, Paulk EM, Hjelm LN, Fridovich-Keil J. A common mutation associated with the Duarte galactosemia allele. *Am J Hum Genet* 1994; 54(6):1030-6.

Elsas LJ, Langley S, Steele E, Evinger J, Fridovich-Keil JL, Brown A, et al. Galactosemia: A Strategy to Identify New Biochemical Phenotypes and Molecular Genotypes. *Am J Hum Genet* 1995; 56:630-639.

Elsas LJ, Lai K, Saunders CJ, Langley SD. Functional analysis of the human galactose-1-phosphate uridylyltransferase promoter in Duarte and LA variant galactosemia. *Mol Genet Metab* 2001; 72(4):297-305.

Elsas LJ, Lai K. The molecular biology of galactosemia. *Genet Med* 1998; 1(1):40-8.

Estrada SC, Canson DM, Silao CL. Mutational analysis of the GALT gene in Filipino patients. *Kobe J Med Sci* 2013; 59(3):E106-11.

Frey PA. The Leloir pathway: a mechanistic imperative for three enzymes to change the stereochemical configuration of a single carbon in galactose. *Faseb J* 1996; 10(4):461-70.

Fusch G, Rochow N, Choi A, Fusch S, Poeschl S, Ubah AO, et al. Rapid measurement of macronutrients in breast milk: How reliable are infrared milk analyzers? *Clin Nutr* 2014; S0261-5614(14):136-8.

Geeganage S, Frey PA. Transient kinetics of formation and reaction of the uridylyl-enzyme form of galactose-1-P uridylyltransferase and its Q168R-variant: insight into the molecular basis of galactosemia. *Biochemistry* 1998; 37(41):14500-7.

Gitzelmann R. Hereditary Galactokinase Deficiency, a Newly Recognized Cause of Juvenile Cataracts. *Pediatric Research* 1967; 1:14–23.

Gitzelmann R. Deficiency of uridine diphosphate galactose 4-epimerase in blood cells of an apparently healthy infant. Preliminary communication. *Helv Paediatr Acta* 1972; 27(2):125-30.

Gitzelmann R, Steinmann B. Galactosemia: how does long-term treatment change the outcome? *Enzyme* 1984; 32(1):37-46.

Goppert F. Galaktosurie nach Milchzuckergabe bei angeborenem, familiaerem chronischem Leberleiden. *Klin Wschr* 1917; 54:473-477.

Gort L, Boleda MD, Tyfield L, Vilarinho L, Rivera I, Cardoso ML, et al. Mutational spectrum of classical galactosaemia in Spain and Portugal. *J Inherit Metab Dis* 2006; 29(6):739-42.

Gort L, Quintana E, Moliner S, González-Quereda L, López-Hernández T, Briones P. An update on the molecular analysis of classical galactosaemia patients diagnosed in Spain and Portugal: 7 new mutations in 17 new families. *Med Clin (Barc)* 2009; 132(18):709-11.

Gray GM, Santiago NA, Colver EH, Genel M. Intestinal beta-galactosidases. II. Biochemical alteration in human lactase deficiency. *J Clin Invest* 1969; 48(4):729-35.

Gubbels CS, Land JA, Evers JL, Bierau J, Menheere PP, Robben SG, et al. Primary ovarian insufficiency in classic galactosemia: role of FSH dysfunction and timing of the lesion. *J Inherit Metab Dis* 2013; 36(1):29-34.

Heidenreich RA, Mallee J, Segal S. Rat galactose-1-phosphate uridylyltransferase coding sequence, transcription start site and genomic organization. *DNA Seq* 1993; 3(5):311-8.

Hennermann JB, Schadewaldt P, Vetter B, Shin YS, Mönch E, Klein J. Features and outcome of galactokinase deficiency in children diagnosed by newborn screening. *J Inherit Metab Dis* 2011; 34(2):399-407.

Holden HM, Rayment I, Thoden JB. Structure and function of enzymes of the Leloir pathway for galactose metabolism. *J Biol Chem* 2003; 278(45):43885-8.

Holton JB, Gillett MG, MacFaul R, Young R. Galactosaemia: a new severe variant due to uridine diphosphate galactose-4-epimerase deficiency. *Arch Dis Child* 1981; 56(11):885-7.

Holton JB, Walter JH, Tyfield LA. Galactosemia. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. 8th ed. New York: McGraw-Hill 2001:1553-88.

Hughes J, Ryan S, Lambert D, Geoghegan O, Clark A, Rogers Y, et al. Outcomes of siblings with classical galactosemia. *J Pediatr* 2009; 154(5):721-6.

Huttenlocher PR, Hillman RE, Hsia YE. Pseudotumor cerebri in galactosemia. *J Pediatr* 1970; 76(6):902-5.

Isselbacher KJ, Anderson EP, Kurahashi K, Kalckar HM. Congenital galactosemia, a single enzymatic block in galactose metabolism. *Science* 1956; 123(3198):635-6.

Jakobs C, Schweitzer S, Dorland B. Galactitol in galactosemia. *Eur J Pediatr* 1995; 154(7 Suppl 2):S50-2.

Johnston M. A model fungal gene regulatory mechanism: the GAL genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Rev* 1987; 51(4):458-76.

Kalaydjieva L, Perez-Lezaun A, Angelicheva D, Onengut S, Dye D, Bosshard NU, et al. A founder mutation in the GK1 gene is responsible for galactokinase deficiency in Roma (Gypsies). *Am J Hum Genet* 1999; 65(5):1299-307.

Kalckar HM, Anderson EP, Isselbacher KJ. Galactosemia, a Congenital Defect in a Nucleotide Transferase: a Preliminary Report. *Proc Natl Acad Sci USA* 1956; 42(2):49-51.

Kaufman FR, Reichardt JK, Ng WG, Xu YK, Manis FR, McBride-Chang C, et al. Correlation of cognitive, neurologic, and ovarian outcome with the Q188R mutation of the galactose-1-phosphate uridylyltransferase gene. *J Pediatr* 1994;125(2):225-7.

Kinoshita JH, Merola LO, Satoh K, Dikmak E. Osmotic changes caused by the accumulation of dulcitol in the lenses of rats fed with galactose. *Nature* 1962; 194:1085–1087.

Kolosha V, Anoaia E, de Cespedes C, Gitzelmann R, Shih L, Casco T, et al. Novel mutations in 13 probands with galactokinase deficiency. *Hum Mutat* 2000;15(5):447-53.

Komrower GM, Schwarz V, Holzel A, Golberg A. A clinical and biochemical study of galactosaemia: a possible explanation for the nature of the biochemical lesion. *Arch Dis Child* 1956; 31(158):254-64.

Kozak L, Francova H, Pijackova A, Macku J, Stastna S, Peskovova K, et al. Presence of a deletion in the 5' upstream region of the GALT gene in Duarte (D2) alleles. *J Med Genet* 1999; 36(7):576-8.

Kozak L, Francova H, Fajkusová L, Pijácková A, Macku J, Stastná S, et al. Mutation analysis of the GALT gene in Czech and Slovak galactosemia populations: identification of six novel mutations, including a stop codon mutation (X380R). *Hum Mutat*. 2000; 15(2):206.

Kramer MS, Kakuma R. Optimal duration of exclusive breastfeeding. *Cochrane Database Syst Rev* 2012 Aug 15;8:CD003517.

Kumar P, Henikoff S, Ng PC. Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nat Protoc* 2009; 4(7):1073-81

Lai K, Langley SD, Singh RH, Dembure PP, Hjelm LN, Elsas LJ. A prevalent mutation for galactosemia among black Americans. *J Pediatr* 1996; 128(1):89-95.

Lai K, Willis AC, Elsas LJ. The biochemical role of glutamine 188 in human galactose-1-phosphate uridylyltransferase. *J Biol Chem* 1999; 274(10):6559-66.

Langley SD, Lai K, Dembure PP, Hjelm LN, Elsas LJ. Molecular basis for Duarte and Los Angeles variant galactosemia. *Am J Hum Genet* 1997; 60(2):366-72.

Lee AY, Chung SK, Chung SS. Demonstration that polyol accumulation is responsible for diabetic cataract by the use of transgenic mice expressing the aldose reductase gene in the lens. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92(7):2780-4.

Leloir LF. The enzymatic transformation of uridine diphosphate glucose into a galactose derivative. *Arch Biochem Biophys* 1951; 33(2):186-90.

Leslie ND, Immerman EB, Flach JE, Florez M, Fridovich-Keil JL, Elsas LJ. The human galactose-1-phosphate uridylyltransferase gene. *Genomics* 1992; 14(2):474-480

Lin LR, Reddy VN, Giblin FJ, Kador PF, Kinoshita JH. Polyol accumulation in cultured human lens epithelial cells. *Exp Eye Res* 1991; 52(1):93-100.

Maceratesi P, Daude N, Dallapiccola B, Novelli G, Allen R, Okano Y, et al. Human UDP-galactose 4' epimerase (GALE) gene and identification of five missense mutations in patients with epimerase-deficiency galactosemia. *Mol Genet Metab* 1998; 63(1):26-30.

Manga N, Jenkins T, Jackson H, Whittaker DA, Lane AB. The molecular basis of transferase galactosaemia in South African negroids. *J Inherit Metab Dis* 1999; 22(1):37-42.

Mason HH, Turner ME. Chronic galactosemia: report of case with studies on carbohydrates. *Am J Dis Child* 1935; 50:359-374.

Mayes JS, Guthrie R. Detection of heterozygotes for galactokinase deficiency in a human population. *Biochem Genet* 1968; 2(3):219-30.

Marvit J, DiLella A, Brayton K, Ledley F, Robson K, Woo S. GT to AT transition at a splice donor site causes skipping of preceding exon in phenylketonuria. *Nucl Acids Res* 1987; 15: 5613-5628.

Mitchell B, Haigis E, Steinmann B, Gitzelmann R. Reversal of UDP-galactose 4-epimerase deficiency of human leukocytes in culture. *Proc Natl Acad Sci USA* 1975; 72(12):5026-30.

Morell-Garcia D, Bauça JM, Barceló A, Perez-Esteban G, Vila M. Usefulness of Benedict's test for the screening of galactosemia. *Clin Biochem* 2014; 47(9):857-9.

Murphy M, McHugh B, Tighe O, Mayne P, O'Neill C, Naughten E, et al. Genetic basis of transferase-deficient galactosaemia in Ireland and the population history of the Irish Travellers. *Eur J Hum Genet* 1999;7(5):549-54.

Novelli G, Reichardt JK. Molecular basis of disorders of human galactose metabolism: past, present, and future. *Mol Genet Metab* 2000; 71(1-2):62-5.

Okano Y, Asada M, Fujimoto A, Ohtake A, Murayama K, Hsiao KJ. A genetic factor for age-related cataract: identification and characterization of a novel galactokinase variant, "Osaka," in Asians. *Am J Hum Genet* 2001; 68(4):1036-42.

Özgül RK, Güzel-Ozantürk A, DüNDAR H, Yücel-Yılmaz D, Coşkun T, Sivri S, et al. Galactosemia in the Turkish population with a high frequency of Q188R mutation and distribution of Duarte-1 and Duarte-2 variations. *J Hum Genet* 2013; 58(10):675-8.

Park HD, Kim YK, Park KU, Kim JQ, Song YH, Song J. A novel c.-22T>C mutation in GALK1 promoter is associated with elevated galactokinase phenotype. *BMC Med Genet* 2009; Mar 24;10:29.

Park HD, Bang YL, Park KU, Kim JQ, Jeong BH, Kim YS, et al. Molecular and biochemical characterization of the GALK1 gene in Korean patients with galactokinase deficiency. *Mol Genet Metab* 2007; 91(3):234-8.

Pastuszak I, O'Donnell J, Elbein AD. Identification of the GalNAc kinase amino acid sequence. *J Biol Chem* 1996; 271(39):23653-6.

Reichardt JK. Genetic basis of galactosemia. *Hum Mutat* 1992; 1(3):190-6.

Reichardt JK, Berg P. Cloning and characterization of a cDNA encoding human galactose-1-phosphate uridyl transferase. *Mol Biol Med* 1988; 5:107-122.

Reichardt JK, Levy HL, Woo SL. Molecular characterization of two galactosemia mutations and one polymorphism: implications for structure-function analysis of human galactose-1-phosphate uridyltransferase. *Biochemistry* 1992; 31(24):5430-3.

Reichardt JK, Packman S, Woo SL. Molecular characterization of two galactosemia mutations: correlation of mutations with highly conserved domains in galactose-1-phosphate uridyl transferase. *Am J Hum Genet* 1991; 49(4):860-7.

Reichardt JK, Woo S. Molecular basis of galactosemia: mutation and polymorphisms in the gene encoding human galactose-1-phosphate uridyltransferase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88(7):2633–2637.

Ridel KR, Leslie ND, Gilbert DL. An updated review of the long-term neurological effects of galactosemia. *Pediatr Neurol* 2005; 33(3):153-61.

Rubio-Agusti I, Carecchio M, Bhatia KP, Kojovic M, Parees I, Chandrashekar HS, et al. Movement disorders in adult patients with classical galactosemia. *Mov Disord* 2013; 28(6):804-10.

Sardharwalla IB, Wraith JE, Bridge C, Fowler B, Roberts SA. A patient with severe type of epimerase deficiency galactosaemia. *J Inher Metab Dis* 1988; 11(suppl.2): 249-251.

Schadewaldt P, Kamalanathan L, Hammen HW, Kotzka J, Wendel U. Endogenous galactose formation in galactose-1-phosphate uridyltransferase deficiency. *Arch Physiol Biochem* 2014;120(5):228-39.

Schadewaldt P, Kamalanathan L, Hammen HW, Wendel U. Age dependence of endogenous galactose formation in Q188R homozygous galactosemic patients. *Mol Genet Metab* 2004; 81(1):31-44.

Shield JP, Wadsworth EJ, MacDonald A, Stephenson A, Tyfield L, Holton JB, et al. The relationship of genotype to cognitive outcome in galactosaemia. *Arch Dis Child* 2000; 83(3):248-50.

Stambolian D, Ai Y, Sidjanin D, Nesburn K, Sathe G, Rosenberg M. Cloning of the galactokinase cDNA and identification of mutations in two families with cataracts. *Nat Genet* 1995;10(3):307-12.

Stenson PD, Mort M, Ball EV, Howells K, Phillips AD, Thomas NS. The Human Gene Mutation Database: building a comprehensive mutation repository for clinical and molecular genetics, diagnostic testing and personalized genomic medicine. *Genome Med* 2009; 1;13.

Tedesco TA, Miller KL, Rawnsley BE, Adams MC, Markus HB, Orkiszewski KG, et al. The Philadelphia variant of galactokinase. *Am J Hum Genet* 1977; 29(3):240-7.

Thalhammer O, Gitzelmann R, Pantlitschko M. Hypergalactosemia and galactosuria due to galactokinase deficiency in a newborn. *Pediatrics* 1968; 42(3):441-5.

Trbusek M, Francová H, Kozák L. Galactosemia: deletion in the 5' upstream region of the GALT gene reduces promoter efficiency. *Hum Genet* 2001; 109(1):117-20.

Tyfield L, Reichardt J, Fridovich-Keil J, Croke DT, Elsas LJ, Strobl W, et al. Classical galactosemia and mutations at the galactose-1-phosphate uridylyltransferase (GALT) gene. *Hum Mutat* 1999; 13: 417-430.

Tyfield LA. Galactosaemia and allelic variation at the galactose-1-phosphate uridylyltransferase gene: a complex relationship between genotype and phenotype. *Eur J Pediatr* 2000;159 Suppl 3:S204-7.

von Reuss A. Zuckerausscheidung im Säuglingsalter. *Wien med Wchnschr* 1908; 58:799-803.

Zhang F, Saha S, Shabalina SA, Kashina A. Differential arginylation of actin isoforms is regulated by coding sequence-dependent degradation. *Science* 2010; 329(5998):1534-7.

Zekanowski C, Radomyska B, Bal J. Molecular characterization of Polish patients with classical galactosaemia. *J Inherit Metab Dis* 1999; 22(5):679-82.

Waggoner DD, Buist NRM, Donnell GN. Long-term prognosis in galactosemia: results of a survey of 350 cases. *J Inherit Metab Dis* 1990; 13: 802–818

World Health Organization (WHO). Global strategy for infant and young child feeding. Geneva: World Health Organization; 2003.

Wright EM, Martín MG, Turk E. Intestinal absorption in health and disease - sugars. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2003; 17(6):943-56.

9. APÊNDICES

9.1. Apêndice A

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu, Daniel Fantozzi Garcia, RG. XXXX, como pesquisador responsável, o Prof. Dr. Wilson Araújo da Silva Júnior, como orientador e o Prof. Dr. José Simon Camelo Junior como coorientador, o(a) convidamos a participar do projeto intitulado **Análise do perfil genotípico de pacientes com galactosemia clássica e estudo da relação do genótipo-fenótipo**, cujas condições são tratadas abaixo.

ESCLARECIMENTOS AO SUJEITO DO ESTUDO

NOME DA PESQUISA: Análise do perfil genotípico de pacientes com galactosemia clássica e estudo da relação do genótipo-fenótipo.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Daniel Fantozzi Garcia

ORIENTADOR: Prof. Dr. Wilson Araújo da Silva Júnior

COORIENTADOR: Prof. Dr. José Simon Camelo Junior

PROMOTORES DA PESQUISA: Departamentos de Genética e de Puericultura e Pediatria da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

TELEFONES DE CONTATO: (16)21019368; (16)36022598

E-MAIL: dfgarcia@hcrp.fmrp.usp.br

ENDEREÇOS: Campus Universitário Monte Alegre - 14.048-900 – Ribeirão Preto, SP

JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS DA PESQUISA

A galactosemia é uma doença genética rara na qual ocorre dificuldade do organismo em metabolizar uma substância normalmente presente na alimentação. O problema é ocasionado pela galactose, um açúcar simples presente no leite materno ou animal e em seus derivados, que faz parte da lactose. Também pode estar presente em alguns legumes, como o feijão. A galactose se acumula na urina, no sangue e nos tecidos dos pacientes com galactosemia podendo causar vômitos, diarreia, alterações no fígado, alterações no sistema nervoso, catarata e predisposição a infecções. O tratamento é simples e consiste na retirada do leite (inclusive materno) e derivados, que se iniciado precocemente na forma neonatal, causa regressão dos sinais em poucas semanas.

Nosso Objetivo é identificar a alteração genética (mutação no DNA) dos indivíduos afetados pela galactosemia e procurar mutações em indivíduos com quadro clínico compatível, além de fazer uma correlação entre a evolução clínica do paciente e a mutação que será detectada através do estudo do DNA. Por se tratar de uma doença genética em que mutações diferentes causam quadros clínicos de gravidade variada, e com tratamento relativamente barato, pois a única terapia existente consiste na restrição dietética de galactose, torna-se claro a importância de se estudar as mutações presentes na população brasileira e de se detectar o mais precoce possível os indivíduos afetados. Os danos causados pela galactosemia podem ser menores se a doença for diagnosticada cedo. Por isso, em muitos centros médicos do mundo, a investigação da galactosemia já está sendo incluída no chamado "teste do pezinho" (ou triagem neonatal), uma medida simples que pode melhorar muito o prognóstico da doença e a nossa intenção é incluí-la também no Brasil.

PROCEDIMENTOS

Você pode auxiliar neste estudo respondendo perguntas a respeito dos antecedentes médicos da pessoa e da família, permitindo que o paciente seja examinado e fotografado para documentação e também permitindo a coleta de

um pouco de sangue (coletado como qualquer outro exame de rotina) e que será usado para estudo genético. Outras pessoas da família além do pai e da mãe (como irmãos do paciente, tios, tias, avós, primos, etc.) poderão ser convidadas a participar da pesquisa, caso haja indicação que também sejam avaliados clinicamente e através de exame de laboratório.

DESCONFORTOS E RISCOS

Os riscos associados ao procedimento de coleta da amostra de sangue são mínimos. A coleta será feita em veia periférica (em geral, do antebraço) por profissional treinado e habilitado para realizar este procedimento e todo material utilizado para a coleta de sangue, como agulhas e seringas, será estéril e descartável. Podem ocorrer dor e mancha roxa no local da coleta. Não será necessário hospitalização, nem jejum.

BENEFÍCIOS

Os estudos a serem realizados servirão como complementos ao acompanhamento médico que já vem sendo feito. A informação obtida a partir do estudo genético pode ser útil para determinar o risco de ocorrer em outros membros da família, principalmente irmãos do afetado, assim pode auxiliar no planejamento reprodutivo do casal (pais do paciente). Identificando a mutação, podemos ter uma idéia da evolução clínica (prognóstico), o que poderá auxiliar a equipe médica a planejar o seguimento, tratamento e prevenção de complicações.

Não haverá nenhuma vantagem direta, tal como renumeração, com a participação do paciente e de sua família no estudo.

DESPESAS E INDENIZAÇÕES

Não haverá despesas adicionais para a família e como os riscos são mínimos não se aplicam indenizações.

ACOMPANHAMENTO E ASSISTÊNCIA

Os resultados dos exames estarão à disposição para acompanhamento no prontuário dos pacientes seguidos no HC-FMRP. Para os pacientes provenientes de outros centros, os resultados estarão sob responsabilidade dos pesquisadores e serão disponibilizados à equipe médica do serviço de origem. Os tratamentos que vem sendo feitos continuarão sob responsabilidade dos profissionais do ambulatório ou do serviço de origem e possivelmente não serão modificados pelos resultados da pesquisa. O paciente ou responsável legal será orientado quanto aos resultados obtidos da pesquisa. Mesmo que não queiram participar, continua assegurado o acompanhamento e tratamento no HC, sem nenhuma diferença.

SIGILO

Todas as informações médicas, assim como os resultados dos testes genéticos decorrentes desta pesquisa, farão parte do prontuário médico do paciente e serão submetidos aos regulamentos do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto referente ao sigilo da informação médica.

As amostras de DNA e células obtidas a partir do sangue coletado e as informações médicas poderão ser compartilhadas com outros pesquisadores. Se esses estudos colaborativos porventura venham a ser feitos, o sigilo será mantido através da utilização de um número de código para a identificação dos indivíduos.

As informações fornecidas por vocês, os resultados dos exames e as fotos dos pacientes poderão ser usadas em congressos, aulas, publicações em revistas científicas, entretanto é assegurado que nenhum nome será divulgado.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu _____, abaixo assinado, tendo sido devidamente esclarecido sobre todas as condições que constam no documento “ESCLARECIMENTOS AO SUJEITO DO ESTUDO”, de que trata o projeto intitulado **Análise do perfil genotípico de pacientes com galactosemia clássica e estudo da relação do genótipo-fenótipo**, cujo pesquisador responsável Daniel Fantozzi Garcia, especialmente no que diz respeito ao objetivo do exame genético molecular, aos procedimentos que serei submetido, aos riscos e benefícios, declaro que tenho pleno conhecimento dos direitos e das condições que me foram assegurados, a seguir relacionados:

1. A garantia de receber a resposta a qualquer pergunta, ao esclarecimento a qualquer dúvida acerca dos procedimentos, riscos, benefícios e de outras situações relacionadas com o estudo e tratamento a que serei submetido.
2. A liberdade de retirar meu consentimento e deixar de participar do estudo, a qualquer momento, sem que isso traga prejuízo à continuação de meu tratamento.
3. A segurança que não serei identificado e que será mantido o caráter confidencial das informações relacionadas à minha privacidade.
4. O compromisso de que me será prestada informação atualizada durante o estudo, ainda que possa afetar minha vontade de continuar dele participando.
5. O compromisso de serei devidamente acompanhado e assistido durante todo o período do estudo, bem como de que será garantida a continuidade de meu tratamento independente de participar ou não deste estudo.

Declaro ainda, que concordo inteiramente com as condições que me foram apresentadas e que, livremente, manifesto a minha vontade de participar do referido projeto.

Ribeirão Preto, _____ de _____ de _____

Assinatura do Paciente ou responsável legal:

Assinatura do Médico responsável pelo esclarecimento das informações contidas neste consentimento.

9.1. Apêndice B

PROTOCOLO CLÍNICO – GALACTOSEMIA

Nome: _____ Registro: _____
 Procedência: _____
 Data Nasc.: _____ Idade: ____ a ____ m Sexo: _____
 Endereço _____
 _____ Telefone para contato: _____

Ancestralidade	Grupo étnico	Local de nascimento
Pai		
Mãe		
Avô paterno		
Avó paterna		
Avô materno		
Avó materna		

Histórico	SIM	NÃO
Consanguinidade entre os pais		
Outros casos na família		
História na família de óbito no 1º ano de vida de causa desconhecida		

SINAIS E SINTOMAS PRECOCES

Dados clínicos		SIM	NÃO
Lesão Hepatocelular	Icterícia (74%)		
	Hepatomegalia (43%)		
	Alteração das enzimas hepática (10%)		
	Coagulopatia (9%)		
	Ascite (4%)		
Intolerância Alimentar	Vômitos (47%)		
	Diarreia (12%)		
	Dificuldade de alimentação (23%)		
Baixo ganho pondero-estatural (29%)			
Letargia (16%)			
Catarata			
Anemia hemolítica			
Hipotonia			
Crises convulsivas (1%)			
Sepse (10%) [<i>Escherichia coli</i>]			
Lesão tubular renal	Galactosúria		
	Glicosúria		
	Acidose metabólica		
	Albuminúria		
	Aminoacidúria		

SINAIS E SINTOMAS TARDIOS

Dados clínicos	SIM	NÃO
Atraso de crescimento (Baixo ganho pondero-estatural)		
Dificuldade de alimentação		
RDNPM / Déficit cognitivo		
Falência ovariana precoce (hipogonadismo hipergonadotrófico)		
Doença neurológica progressiva com ataxia		

RESULTADO DE EXAMES

	DATA	RESULTADO
Hemograma		Hematócrito:
		Leucócitos:
		Plaquetas:
Urina rotina		
Função hepática		TGO:
		TGP:
		Bilirrubinas:
		Outros:
Provas de coagulação		TAP / INR:
		TTPA:
		TS / TC:
Glicemia		
Cromatografia de aminoácidos		
Clinitest		
Glucostix		
Dosagem da atividade da GALT		
Dosagem de galactose-1-fosfato		

Ressonância de encéfalo:

Outros:

```

85                                     V N
1801 caggtaactggtggtatggggcagtgagtgcttctagcctatccttgtcggtagGTGAAT
87 P Q Y D S T F L F D N D F P A L Q P D A
1861 CCCAGTACGATAGCACCTTCCTGTTTGACAACGACTTCCCAGCTCTGCAGCCTGATGCC
> delACA
107 P S P G
1921 CCCAGTCCAGGtaacctggctccaactgctgctggggaggagggtggctagacctcttga
> a
111                                     P S D H P L F
1981 gggacttctgctgcagagagtgatactcctttacctcagGACCCAGTGATCATCCCCTTT
118 Q A K S A R G V C
2041 TCCAAGCAAAGTCTGCTCGAGGAGTCTGgtaactatggatttcccctcttacaactttca
> c
2101 aaccagagattggagactcagcattgggggttcggccctgcccgtagcacagccaagcccta
127 K V M C F H>YP W S
2161 cctctcggttatcttttctcccgtcaccaccagTAAGGTCATGTGCTTCACCCCTGGT
> TAC T
136 >LD V T L P L M S V P E I R A V V D A W A
2221 CGGATGTAACGCTGCCACTCATGTTCGGTCCCTGAGATCCGGGCTGTTGTTGATGCATGGG
> TG
156 S V T E E L G A Q Y P W V Q>P
2281 CCTCAGTCACAGAGGAGCTGGGTGCCAGTACCCTTGGGTGCAGgtttgtgaggtcgccc
> CCG
2341 cttcccctggatgggcagggagggggtgatgaagccttgggttctgaggagtaacatttct
2401 gtttccacaggggtgtggtcaggagggagttagcttgggtgtcttttggctaacaagctcc
170 I>IF>SE N K G>DA M M G C S N P H
2461 gtatccctatctgatagATCTTTGAAAAACAAAGGTGCCATGATGGGCTGTTCTAACCCCC
> ATATCT GAT
185 P H C Q>R
2521 ACCCCCACTGCACGtaagggtgtcaggggctccagtgggttttcttggctgagctgagc
> CCG
2581 cagcactgtggacatgggaacaggattaatggatgggacagaggaaatatgccaatgatg
189 V W
2641 tggaggcttggaggtaaaggacctgacctgttcttctctgcttttggcccttgacagGTAT
191 A S S F L P D I A Q R E E R>S Q Q A Y K
2701 GGGCCAGCAGTTTCTTGCCAGATATTGCCAGCGTGAGGAGCGATCTCAGCAGGCCTATA
> TGA
211 S Q H G E P L L>LM E Y S R Q E L L R K
2761 AGAGTCAGCATGGAGAGCCCCTGCTAATGGAGTACAGCCGCCAGGAGCTACTCAGGAAGg
> TTA
2821 tgggagagagccaagccctgtgtccccaaggagtcacctaaactttcttatcccatgagaga
2881 ggtgtgttaaaggagaaaagctagaggtgaactagtagagagagacttgctaggaggcctta
2941 gcaataatccagtaaatctaaaggaaagatgatggtgacttagactcgggtggttagtggt
3001 agaggtggtgagaagacatcagatcctgggcacattcctttcttctgcttcccttgcccta
3061 tttgctgaccacactccggtccttatgtcaccttgatgacttcctatccattctgtcttc
230 E R>HL V L T S E H W L V L V P F W A T
3121 ctagGAACTGGTCCCTAACCACTGAGCACTGGTTAGTACTGGTCCCCTTCTGGGCAAC
> CAT
249 W P Y Q T L L L P R R H V R R L P E L T
3181 ATGGCCCTACCAGACACTGCTGCTGCCCCGTCGGCATGTGCGGCGGCTACCTGAGCTGAC
269 P A E R D D
3241 CCCTGCTGAGCGTGATGgtcagctctcccaagtaggatcctggggctaggcactggatgga
3301 ggttgctcccagtagggtcagcatctggacccaggctgagagtcaggctctgattccag
275 LfsA S I M K K L L T K>NY D N L F E T>TS>SF
3361 ATCTAGCCTCCATCATGAAGAAGCTCTTGACCAAGTATGACAACCTCTTTGAGACGTCC
> delT AAT ACATCT
295 P Y S M G W H G
3421 TTCCCTACTCCATGGGCTGGCATGgtgaggcttttcaagtacctatatttagccccaaca
3481 ccatcttctgggctcctggggctcagcctagtgaactgcaacctcaaaggagcaagccttg
3541 aaacagttgctgggggaagtggccagagtagagatgctgggactgaggggtggagcagcaa
3601 acttggtgaaactacatctccaatgtgctttctaactcctgcccagctcttctcaagcag

```

```

3661 gggatcctgggagatgtagttttcagatacctggttgggtttgggagtaggtgctaacct
303                                     A P
3721 ggataactgtaaaagggctctctctccccactgtctctcttcttctgtcagGGGCTCCC
305 T G S E A G A N W N>DH>HW Q L H A H Y Y P
3781 ACAGGATCAGAGGCTGGGGCCAACTGGGACCATTTGGCAGCTGCACGCTCATTACTACCTT
>
325 P>LL L R S A T V R K F M V G Y E M L A Q
3841 CCGCTCCTGCGCTCTGCCACTGTCCGGAATTCATGGTTGGCTACGAAATGCTTGCTCAG
>
345 A Q R D L T P E Q
3901 GCTCAGAGGGACCTCACCCCTGAGCAGgtcaggactcagaacagtctggcgtctccagac
3961 tctcacatgcagtatgtgcaggcacctgatacttctgttgcccttgtgctccagtcattg
4021 cacaaggcagaaaaacagctctggcaggaagggaactgcctaaagttaggagccctagggcct
4081 ggaaggagagtatggtcctcagatcccccttctctcctgcttctctccagggaacccaaca
4141 gtcattgacctgatagtttcccataacaacctgggcattccttgggactcaggagctgct
4201 aaactctttcatccccctggtggccttcagcagtccttatcaccagcctcacaatcccacag
4261 gccacccccagtgggcctgtggcattcatatttcatatttcatatttcaaaccacaatat
4321 ccagcaaaatgtctcctgagcaccagaaactccataccatcgggccgggtgtggtggctca
4381 tgccttaatcccagcactttgggaggtcaagatgggaggattgcttgagcccagaagttc
4441 gagactagcctgggaaacataggaagccctcgtctctacaaaaaaattttaaagttag
4501 ccaggatggtggcatatacttgtggtcccagatacttgggaggctgagataggatcact
4561 tgggcccaggagtttgaggctgcagtgagccatcatcatggcatcattgcattccagcct
4621 gggcaacagagcaagacctcgtctcaaaaaaaaaaaaaaaaaatgaagtccatgccaccatt
354                                     A A E
4681 cttggcagcccagcccttatcctccttaattgctccctgtcccttttcagGCTGCAGAG
357 R L R A L P E V H Y H L G Q K D R E T A
4741 AGACTAAGGGCACTTCCTGAGGTTTATTACCACCTGGGGCAGAAGGACAGGGAGACAGCA
377 T I A *
4801 ACCATCGCCTGAaccacgcccagaccacagggccttgaatcctttttgttttcaacagtctt
4861 gctgaattaagcagaaaaggccttgaatcctggcctggaatttgggcagatatagcatta
4921 ataaaaactgtgcatctcaaaacttttatcacatactctaataatcagaggagtgtgaacctt
4981 cagagatctagggttaaaaagctaaaggcatagctcagctacaacttttcttctgtctaca
5041 gatgtgtaaaaatcttgatgcaaaaatctaccccaatttctgaacaaaattaatattcag
5101 tattatatctagcctatagattctcttactcttgggtgtaaagacagcattcccagtttag
5161 gaaactgttttaaaaatcttgtgtcttgggtgtggctgaggcttgggaaggccagagccc
5221 cctttgccaccacccttagggtgtcagctccaagcctgggcctgagggttgatggggag
5281 cgggtgagctggatcctgatcccagtggtcagtgccagatcctgggctgctggccagaa
5341 ccctggctttgtgagtggctgcagcttggctctgctccagcccacaggggctaaaggggc
5401 gggtagggagtggttagggagcgtgtacgtggcttggctccttggctcctccagactct
5461 cacatgtgcgggcaccatatacttctgctgcccttgtgccccaatcattgcacaaacaga
5521 aacagctctgacagagaagggactgctagagtttaggaacctagggcctggaaggaaggt
5581 atggctctcagagtgcctgggtctattcagtcacctctggacctgtttccctggcaac
5641 gctgtgggaacaacagctctatgcaacacaggagacctgatgccactgggtgtcctccaat
5701 ttaaggcgaaggcaggcattgtgaatgatgcagggatggccagaatggtttttgccttc
5761 gttctttccccaggggaaccaagcctgtgggtgggaaatcacactaaggctggacagtg
5821 actgaatctggcccagagaaacttggctgctgccttccagaccagggtttttcttccc
5881 tgagatcctggaggggaagtacctggaacttgggagtggtgccctggctggaagatct

```

9.4. Apêndice D – *GALK1*: Sequência genômica e proteica, destacando posição dos primers (grifados em cinza) e mutações encontradas

GALK1 - Galactokinase

chromosome: 17; Location: 17q24

```

1  ctccactaaaaatacaaaaaaattagccgggcatggtggcacgtgcctgtaatcccagcta
61  ctccggaggctgaggcaggagaatcgcttgaacccgggaggcagaggttcagtaagctg
121 agatcacgccattgcactccagcttgacaacgagagcgaaactccgtctcaaaaacaga
181 aaccaaataaacatttcctaaccaatgtcacaaaactgtaccctatgttttcttctaag
241 agttttcagaattgcccttggaatgcagttcccccactctttgggcacacccctgagcagg
301 ccccaagctaaatccctggccataaactccccacactactcccaccctaaccccaagcaag
361 ctgcttacatttcagtccttcagtttcaaggttccatgtaggggtgggcagctgtggacag
421 gtatcaaggcagcagttggggccggccagcaggttaggatgcaggatagcaagagaaga
481 gtgcctgactgggaacaaggccacgcctctgagacaagggtcttctgggctgaagtagtgc
541 ctgctggggccaacagcacaaacctacctggacagctgtggcaggtccttaagggaggggc
601 tgggcccactgctggccaccgcccaccctagtccaattctccattgctaggagctgttgcg
661 tattacctagaaaaggagcttgtaaaattgactctctgtgcccaggctggagtgcattggtgatctc
721 ttttttttgagacagagttttgtctctgttggccaggctggagtgcattggtgatctc
781 agctcacccgaaaacctccgcctcccaggttcaagtgattctcctgcctcagcctcccagat
841 agctgggattacaggcatgagccaccatgccagctaattttgtatttttagtagagat
901 ggggtttctccatgttggtcaggtgtgtctccaactcccacactcaggtgatctgcacac
961 ctcggcctcccaaagtgtggtgattacaggcgtgagccactgcgcccggcccaaacttgt
1021 ctgtctttatctctacttacagtgaagtgtcaggtcacctcttggagaccggtgatcaga
1081 ggctgatgacctctcacagctgtggtccctggggacctaggggatccctttgggaatccc
1141 aggtcaaccgggtgccagctccattgtctgtggtgtgtgggtgggtgggtgggtgagggc
1201 acatagaaagtcaccagcgccagggaagggcagctcagaaatcctgggtcatgccaagtgc
1261 cactcagggctattctcactctagtgaagtgcctcattgggtcttcccgaagtcagagggga
1321 aggacaccatcgggggcgctgtatcccacccggcaccattagcccctgccacccaccacc
1381 cagcagctggattcccacgggagttgcgggtggggcggaaccggctgaggtctgggggc
1441 ggggcgtccgggcgcggggcggggctggcggggaatgtgcgcacccccgcgcggggccccg
1501 cccgagcatcccgcgcccagcggggctgtgcccggagcagctgtgcagagctgcaggcgcgc
1561 gtcATGGCTGCTTTGAGACAGCCCCAGGTCGCGGAGCTGCTGGCCGAGGCCCGCGGAGCC
20  F R E E F G A E P E L A V S A P G R V N
1621 TTCCGGGAGGAGTTCCGGGGCCGAGCCGAGCTGGCCGTGTCAGCGCCGGGCCGCGTCAAC
40  L I G E H T D Y N Q G L V L P M
1681 CTCATCGGGGAACACACGGACTACAACCAGGGCCTGGTGCTGCCTATGgtgaggggctgc
1741 acgggggagcccctagcccgcgcgcgctgtcccggccgcgcgaggagggcgggcctcgggg
1801 acgctgggggagagttcttcccgcgggagatgtggggcgggcagctgcgctggagcacc
1861 ggtgcacggaagagtccccgggacaggctgttccccacgttgggaaggagggaagcgagga
1921 agtggccgggagaggggtgcgcggccgcctcttggctcaagccgcctctgggggctggg
1981 gctcctgccttcaacctgggagcatgttcccctaaactgtgaggccctgtgtgccacg
2041 cagaaggggacactccgcgcctccggccaccgtggggccccaaccgcagacctgggcgaa
2101 cgtagccttctggcccagcccgttcaatttacagaggaggaaactgaggcctagagaggc
2161 ccagtgaactgctggaggtcacacagcaggttcttggcggggctgcgacttgggagtgag
2221 gactcccagctttcagcggggggcgctttccgccccatctgcagcttggggagtgacag
2281 gtacaggatgtccagagccaccccaaatgtaaaggctttggagctccagtgatctgttt
2341 tccctttgggctagctctcccccttgcacacagctcagggcagagtcaggtctgtgct

```

2401 ccagctgcagccgccccgcccctgaagacctaagggggcagggctcaagcccccaaggtc
 2461 agctggccctcaggatcttccctgcgacgtgaacctggaggttcagaacctgatgactg
 2521 tggaggcatcagaacctcggctggaggcagtggtcattggagaggcttactccagctggcg
 56 A L E L M T V L V
 2581 gaagcctcacgtactgcttgtctctcctgccagGCTCTGGAGCTCATGACGGTGCTGGTG
 65 G S P R K D G L V S L L T T S E G A D E
 2641 GGCAGCCCCGCAAGGATGGGCTGGTGTCTCTCCTCACCACCTCTGAGGGTGCCGATGAG
 85 P Q R L Q F P L P T A Q R S L E P G T P
 2701 CCCAGCGGCTGCAGTTTCCACTGCCACAGCCCAGCGCTCGCTGGAGCCTGGGACTCCT
 105 R W A N Y V K G V I Q Y Y P A
 2761 CGGTGGGCCAACTATGTCAAGGGAGTGATTCACTACTACCCAGGtatggggcccaggcct
 2821 gagccaagtcctcactgatactaggtgtccacctcacagccacagagccattcatttg
 2881 tctgatacactgtggggaaggcttgttagagtggagcatcccattgtacagatgaggaaac
 2941 tgatgcccccagaaggctcggaacttgccctgggtttcccgtagctgattggaggagcc
 3001 aggatttgaaccccagccttttttccctccagagccctaaaccaggaggacaattagaag
 3061 tgtcccgacaacctcagagggtgggaaaatggagggcagtggtcccttgcccagcagg
 3121 ttggtggcttctgacaattgagacacacaccctagaaacagctgctaggccgttgctgcc
 3181 cttcccgccaggacacctgccccttctgtgccatcctcccaggcagccctcttaccatc
 120 A P L P G F S A V V V S S
 3241 acctgttctttcccctgcagCTGCCCCCTCCCTGGCTTCAGTGCAGTGGTGGTCAGCTC
 133 V P L G G G L S S S A S L E V A T Y T F
 3301 AGTGGCCCTGGGGGGTGGCCTGTCCAGCTCAGCATCCTTGGAAGTGGCCACGTACACCTT
 153 L Q Q L C P D
 3361 CCTCCAGCAGCTCTGTCCAGgtaccagctaggccccagccctgaccagccctccttccc
 3421 tgagggtctccaggtgggtcccagcttctactatgccttatggagggggtggcagggtactc
 3481 cctggagtggtcattgaagccaactgctgtcttccaccagccctagcctcccacctcacc
 160 S G T I A G A R A Q V C Q A E H
 3541 tgtactgcagACTCGGGCACAATAGCTGCCGCGCCAGGTGTGTGACAGGCCGAGCAC
 176 S F A G M P C G I M D Q F I S L M G Q K
 3601 AGCTTCGCAGGGATGCCCTGTGGCATCATGGACCAGTTCATCTCACTTATGGGACAGAAA
 196 G H A L L I D C R
 3661 GGCCACGCGCTGCTCATTGACTGCAGgttgggctcgtctcccctcgtcccctcccgcctg
 3721 cactcagcagctcctgggtgggagtgtgccactgcctggcgagcaagcacagcttgg
 205 S L E T S L V P L
 3781 cctcgtcatctccccattgttaactccaccccagGTCCTTGGAGACCAGCCTGGTGCCAC
 214 S D P K L A V L I T N S N V R H S L A S
 3841 TCTCGGACCCCCAAGCTGGCCGTGCTCATCACCAACTCTAATGTCCGCCACTCCCTGGCCT
 234 S E Y P V R R R Q C E E V A R A L G K E
 3901 CCAGCGAGTACCCTGTGCGGCGGCCAATGTGAAGAAGTGGCCCGGGCGCTGGGCAAGG
 254 S L R>WE V Q L E E L E A
 3961 AAAGCCTCGGAGGTTACAACTGGAAGAGCTAGAGGgtgagaactgccagggtgctctat
 TGG
 4021 cctggaggcggtgtgctccctgctggcgccctcagtggtggccttgaccctgctgggacc
 4081 ccgatctccagggccttctgcatgtctctcccagctcccttcaaacactgcgcaccagc
 4141 gttccaatctcagcagggtgcttgaaatcctaaaatggcttatctaatcagaaaaatc
 4201 atgtttccattgtggaaaatgtagaaaagtacaaaagttagaaaataataagctataaggcc
 4261 actaccagagatagccactgctgacattttcacgttttctttcagtatttttccacatc
 4321 tgtcttcaaagctgagtatatgtaatatatcatcactttccccccccacccccctttttt
 4381 taagaggcagggtctcattctgttgcccaagctggagtgtagtgggtgatcatagctta
 4441 ctgcaaacttgaactcttgagctcaagggtatcctcccagctcagccttccaagtagctga
 4501 gattacagggtgtgccaccatgcccggctaatttttatctttgtaaagacggcttgcagt
 4561 gttgcccaggctgatcctgaactctggcctcaagtggctcctcctgcttggcctcccaa
 4621 gtgttgggattataggcatgagccactgcgcccagcccatttgccgtgttttttttttgg
 4681 acacagagtttcggctctgtcacccatgctggagtgaatgggtgcgatctcagctcactg
 4741 taacctctgcctcccgggttcaagtgttctcctgcctcagcctcccagtagctgggac
 4801 tacaggcgccccgccactacgcctggcacattttttatagttctagtagagactggggtt
 4861 caccatgttggccagggtggtctcaaagcctgacctcaggtgatcctccgcctcagcc
 4921 ttccaaagtgtgggattacaggcgtgagccatagtgcgggtctctttttttttttttt
 4981 taaactaaacataatctcagaacccagaaccctatcttatcttatgccatgaaaggcata
 5041 tctcgggtgtggctctttttttttttttttcttttttttttgggtgaggtggaggttggcc
 5101 tgttgcccaggctggagtgcagtggcgcaatctcggctcactgcacccctcctcgtg

>

9.5. Apêndice E – Cromatogramas do sequenciamento dos pacientes com galactosemia deste estudo, destacando as mutações encontradas no gene *GALT*

9.6. Apêndice F – Resultado completo das simulações *in silico*

SIFT

User input Coordinates	Codons	Transcript ID	Substit.	Region	dbSNP ID	SNP/Mutation Type	Prediction	SIFT Score	Median Information Content
9,34646703,1,T/C	ATG-AcG	ENST00000378842	M1T	EXON CDS	novel	Nonsynonymous	DAMAGING *Warning! Low confidence.	0	3.45
9,34647100,1,C/A	CGC-aGC	ENST00000378842	R33S	EXON CDS	novel	Nonsynonymous	DAMAGING	0	2.98
9,34647101,1,G/A	CGC-CaC	ENST00000378842	R33H	EXON CDS	rs111033829:A	Nonsynonymous	DAMAGING	0	2.98
9,34647220,1,C/T	CCT-tCT	ENST00000378842	P73S	EXON CDS	novel	Nonsynonymous	TOLERATED	0.12	3.01
9,34647241,1,C/T	CGA-tGA	ENST00000378842	R80*	EXON CDS	rs111033664:T	Nonsense	N/A	N/A	N/A
9,34647845,1,C/T	CAC-tAC	ENST00000378842	H132Y	EXON CDS	rs111033688:T	Nonsynonymous	DAMAGING	0.01	3.01
9,34647855,1,C/T	TCG-TtG	ENST00000378842	S135L	EXON CDS	rs111033690:T	Nonsynonymous	DAMAGING	0.02	3.01
9,34647957,1,A/C	CAG-CcG	ENST00000378842	Q169P	EXON CDS	novel	Nonsynonymous	DAMAGING	0	3.01
9,34648114,1,C/A	ATC-ATa	ENST00000378842	I170I	EXON CDS	rs61735984:A	Synonymous	TOLERATED	1	3.01
9,34648116,1,T/C	TTT-TcT	ENST00000378842	F171S	EXON CDS	rs111033715:C	Nonsynonymous	DAMAGING	0	3.01
9,34648128,1,G/A	GGT-GaT	ENST00000378842	G175D	EXON CDS	rs111033718:A	Nonsynonymous	DAMAGING	0	3.01
9,34648167,1,A/G	CAG-CgG	ENST00000378842	Q188R	EXON CDS	rs75391579:G	Nonsynonymous	DAMAGING	0	3.01
9,34648376,1,C/T	CGA-tGA	ENST00000378842	R204*	EXON CDS	rs111033737:T	Nonsense	N/A	N/A	N/A
9,34648763,1,G/A	CGT-CaT	ENST00000378842	R231H	EXON CDS	rs111033754:A	Nonsynonymous	DAMAGING	0	3.01
9,34648998,T,.		ENST00000378842	L275fs	EXON CDS	rs111033777	Frameshift	N/A	N/A	N/A
9,34649029,1,G/T	AAG-AAt	ENST00000378842	K285N	EXON CDS	rs111033773:T	Nonsynonymous	DAMAGING	0	3.01
9,34649050,1,G/A	ACG-ACa	ENST00000378842	T292T	EXON CDS	rs1055607:A	Synonymous	TOLERATED	1	3.01
9,34649053,1,C/T	TCC-TCt	ENST00000378842	S293S	EXON CDS	rs115527942:T	Synonymous	TOLERATED	1	3.01
9,34649442,1,A/G	AAC-gAC	ENST00000378842	N314D	EXON CDS	rs2070074:G	Nonsynonymous	TOLERATED	1	3.01
9,34649447,1,T/C	CAT-CAc	ENST00000378842	H315H	EXON CDS	rs61735982:C	Synonymous	TOLERATED	1	3
9,34649476,1,C/T	CCG-CtG	ENST00000378842	P325L	EXON CDS	rs111033794:T	Nonsynonymous	DAMAGING	0	3.01

Poliphen-2

Substitution	Protein Acc	Prediction	Score	sensitivity	specificity
M1T #	P07902	BENIGN	0.00	1.00	0.00
R33S #	P07902	PROBABLY DAMAGING	1.00	0.00	1.00
R33H	P07902	PROBABLY DAMAGING	1.00	0.00	1.00
P73S #	P07902	PROBABLY DAMAGING	0.996	0.55	0.98
H132Y	P07902	POSSIBLY DAMAGING	0.685	0.86	0.92
S135L	P07902	POSSIBLY DAMAGING	0.940	0.80	0.94
Q169P #	P07902	PROBABLY DAMAGING	0.959	0.78	0.95
F171S	P07902	PROBABLY DAMAGING	1.00	0.00	1.00
G175D	P07902	PROBABLY DAMAGING	1.00	0.00	1.00
Q188R	P07902	PROBABLY DAMAGING	1.00	0.00	1.00
R231H	P07902	PROBABLY DAMAGING	1.00	0.00	1.00
K285N	P07902	PROBABLY DAMAGING	0.996	0.55	0.98
N314D	P07902	BENIGN	0.00	1.00	0.00
P325L	P07902	PROBABLY DAMAGING	1.00	0.00	1.00

mutações novas

9.7. Apêndice G – Resumo dos resultados

Pacientes	Atividade GALT (mmol/h/g Hb)	Genótipo <i>GALT</i>	Diagnóstico
GAL1	Indetectável	Q188R/Q188R	Galactosemia clássica
GAL2	26,0	N314D/N314D	Homozigoto Duarte
GAL3	7,0	H132Y/T292T+H315H	Portador da GC
GAL4	Indetectável	S135L/Q188R	Galactosemia clássica
GAL5	11,0	IVS3nt+1G>A /Q188R	Galactosemia clássica
GAL6	Indetectável	S135L/K285N	Galactosemia clássica
GAL7	1,5	M1T /S135L	Galactosemia clássica
GAL8	47,0	WT/WT	Galactosemia do tipo 2
GAL9	5,0	Q188R/Q188R	Galactosemia clássica
GAL10	...	WT/P325L	Portador da GC
GAL11	3,0	P73S /N314D	Galactosemia Duarte
GAL12	13,0	R204X/N314D	Galactosemia Duarte
GAL13	19,0	R204X/N314D	Galactosemia Duarte
GAL14	21,0	R33S /S293S	Portador da GC
GAL15	1,0	M1T /S135L	Galactosemia clássica
GAL16	Indetectável	S135L/G175D	Galactosemia clássica
GAL17	Indetectável	Q169P /Q188R	Galactosemia clássica
GAL18	Indetectável	S135L/Q188R	Galactosemia clássica
GAL19	Indetectável	S135L/F171S	Galactosemia clássica
GAL20	13,0	I170I/Q188R	Portador da GC
GAL21	12,0	R33H/S135L	Galactosemia clássica
GAL22	3,1	Q188R/Q188R	Galactosemia clássica
GAL23	10,0	G175D/N314D	Galactosemia Duarte
GAL24	1,5	Q188R/Q188R	Galactosemia clássica
GAL25	Indetectável	IVSnt4+4A>C /R231H	Galactosemia clássica
GAL26	29,0	Q188R/N314D	Duarte galactosemia
GAL27	13,3	IVS4nt+4A>C /Q188R	Galactosemia clássica
GAL28	Indetectável	S135L/L275fs	Galactosemia clássica
GAL29	29,8	N97del /N314D	Duarte galactosemia
GAL30	Indetectável	M1T /Q188R	Galactosemia clássica
GAL31	14,5	Q188R/K285N	Galactosemia clássica

9.8. Apêndice H – Artigo que será submetido para publicação no Human Mutation

Clinical Profile and Molecular Characterization of Galactosemia in Brazil: Identification of Seven Novel Mutations

Daniel F. Garcia^{1,4}, José S. Camelo Jr², Marlene Turcato³, Greice A. Molfetta^{4,8}, Adriana A. Marques⁴, Carolina F.M. Souza⁵, Gilda Porta⁶, Carlos E Steiner⁷, Wilson A Silva Jr^{1,4,8}.

1. *Department of Genetics, Ribeirão Preto Medical School – University of São Paulo - Ribeirão Preto, SP, Brazil.*
2. *Department of Pediatrics, Ribeirão Preto Medical School – University of São Paulo - Ribeirão Preto, SP, Brazil.*
3. *Department of Neurology, Ribeirão Preto Medical School – University of São Paulo - Ribeirão Preto, SP, Brazil.*
4. *Centro Regional de Hemoterapia de Ribeirão Preto, Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Terapia Celular e Centro de Terapia Celular, Ribeirão Preto, SP, Brazil.*
5. *Department of Genetics, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil*
6. *Department of Pediatrics, Children's Institute - Medical School of the University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil*
7. *Department of Medical Genetics, School of Medical Science, State University of Campinas, Campinas, SP, Brazil*
8. *Center for Medical Genomics at Clinical Hospital of the Medical School of Ribeirão Preto, University of São Paulo – Ribeirão Preto, SP, Brazil*

Abstract

Classical galactosemia (CG) is an inborn error of galactose metabolism caused by the deficiency of the galactose-1-phosphate uridylyltransferase enzyme. It is transmitted as an autosomal recessive disease and is typically characterized by neonatal galactose intolerance, with complications ranging from neonatal jaundice and liver failure to late complications, such as motor and reproductive dysfunctions. Galactosemia is also heterogeneous from a molecular standpoint, with several mutations described in the *GALT* gene, some of them specific to certain populations, reflecting what is expected as some events of founder effect. This study reviews the main clinical findings and depicts the spectrum of mutations identified in 19 patients with CG, six with Duarte Galactosemia and one with type 2 Galactosemia in Brazil. Some individuals were diagnosed through expanded newborn screening test, which is not available routinely to all newborns. The main classical galactosemia mutations reported in the literature were identified in this study (p.Q188R, p.S135L and p.K285N), as well as the Duarte variant and seven novel mutations (p.M1T, p.R33S, p.P73S, IVS3+1G>A, IVS4+4A>C, p.N97del and p.Q169P), which was expected, given the high miscegenation of the Brazilian population. This study expands the mutation

spectrum in *GALT* gene and reinforces the importance of early diagnosis and introduction of dietary treatment; it also adds more evidence for discussions on the introduction of galactosemia in the Brazilian neonatal screening program.

Introduction

The ubiquitously expressed enzyme galactose-1-phosphate uridylyltransferase (*GALT*; EC 2.7.7.12) is a component of the galactose metabolism pathway that catalyzes the conversion of galactose-1-phosphate with UDP glucose to glucose-1-phosphate and UDP galactose (Leloir and Cardini 1957; Holden et al 2003). Its deficiency causes classical galactosemia [CG; MIM#230400] (Kalckar et al 1956); this condition manifests in the neonatal period with poor feeding, vomiting, diarrhea, jaundice, liver and renal failure, hypoglycemia, muscular hypotonia, sepsis and cataract (Holton and Tyfield 2001; Bosch 2006). The treatment is the diet restriction of lactose-containing foods, which reverses the majority of neonatal symptoms, but does not prevent late complications such as impairment of mental development, disorders of speech and motor function, and reproductive system abnormalities in some cases (Waggoner et al 1990; Schweitzer et al 1993; Kaufman et al 1994; Nelson 1995; Ridel et al 2005; Bosch 2006; Gubbels et al 2013). The gene that encodes *GALT* (NG_009029.1) was cloned and characterized by Reichardt and Berg (1988), it is located on chromosome 9p13 (Shih et al 1984), with approximately 4kb of DNA sequence arranged into 11 exons. The CG is inherited as an autosomal recessive disease and 266 different mutations have been identified so far (Calderon et al 2007).

Galactosemia is heterogeneous at the molecular level, which reflects the well documented clinical variability observed, even among patients with the same *GALT* genotype. There are some common mutations in CG, as the p.Q188R and the p.K285N (Tyfield et al 1999) in Caucasian populations and the p.S135L (Lai et al 1996) in individuals of African origin. Beside the deleterious mutations, the most common *GALT* mutant is Duarte 2 (D2) allele, characterized by some sequence changes: a p.N314D missense substitution, three intronic base changes and a 4bp deletion in the 5' proximal sequence (Elsas et al 1994; Shin et al 1998; Kozak and Francova 1999). The D2 allele in heterozygous with one

allele of CG, causes a mild type of galactosemia called Duarte galactosemia. Apart from GALT deficiency galactosemia, there are also other rare types of galactose metabolism diseases, type II galactosemia (OMIM 230200), caused by deficiency of the enzyme galactokinase (GALK, EC 2.7.1.6), characterized by early onset bilateral cataract (Hennermann et al 2011) without liver or cognitive impairment, and type III galactosemia (OMIM #230350) caused by mutations in *GALE* gene (EC 5.1.3.2) leading to UDP-galactose 4-epimerase deficiency (Timson 2006).

The aim of this study is to describe the profile of mutations in the *GALT* gene of the Brazilian patients with classical galactosemia and for newborns that present positive galactosemia newborn screening test, in addition to studying the genotype-phenotype correlation. This study provides important information for discussions about the introduction of galactosemia in the national newborn screening program in Brazil, where the prevalence of CG is estimated close to 1:20,000 (Camelo Jr et al 2009).

Materials and methods

Patients and ethical aspects

Thirty patients, including two sib pairs, who have the diagnosis of galactosemia confirmed by biochemical analysis, were analyzed. The source of patients was the Hospital of the Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo (8 patients) and other services and hospitals in Brazil (22 patients). Six patients of the study were diagnosed through expanded newborn screening test, which is not available as routine for all newborns in Brazil. Therefore, these patients started treatment before showing symptoms, and analysis of genotype-phenotype correlation was not performed. Clinical data of patients were obtained from a review of the medical records, using a standardized form. The Research Ethics Committee of the Hospital approved the study and a written informed consent was obtained from each patient or responsible family member.

Red blood cell GALT assay

The GALT enzyme activity was detected by an enzymatic-fluorometric method (Dahlqvist 1971). The fluorescence reading at 460nm was obtained with a Hitachi F-2000 fluorometer (Hitachi, Tokyo, Japan) and to measure haemoglobin concentration, an absorbance reading at 410nm was obtained with a Hitachi U-2001 spectrophotometer (Hitachi, Tokyo, Japan). The normal range was defined as 37– 66 $\mu\text{mol/h}$ per gHb.

DNA amplification and exon sequencing

All patients were subjected to exons sequencing of the *GALT* gene. In order to diagnose a possible galactosemia due to galactokinase deficiency, one patient with elevated total galactose and normal erythrocyte *GALT* enzyme activity also underwent *GALK1* gene exons sequencing.

Genomic DNA was extracted from peripheral blood leukocytes, using a Super Quick-gene-rapid DNA isolation kit (Promega, Madison, WI, USA), following the manufacturer's instructions. Eight pairs of primers were designed to amplify the promoter region, the 11 exons and adjacent intronic regions of the *GALT* gene. For the analysis of the *GALK1* gene, six pairs of primers were designed to cover the eight exons and their respective splice site junctions (primer sequences and PCR conditions in Supplemental material S1).

The PCR-amplified DNA fragments were subjected to direct sequencing in an automatic capillary sequencing system ABI 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), using the Big Dye® terminator v3.1 cycle sequencing kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and the same PCR primers, following the manufacturer's instructions. The results were analyzed using the FinchTV version 1.4.0 (Geospiza, Seattle, WA, USA) and Codoncode Aligner (Codoncode, Centerville, MA, USA). The sequences obtained were compared with the reference ones from GenBank database (NG_009029.1/ NM_000155.3 and NG_008079.1/NM_000154.1).

In silico analysis

In order to predict damage effects of missense and splice site mutations, the following bioinformatics tools were used: 1) SIFT (Kumar et al 2009), that

classify variants according to mathematical operations; 2) PolyPhen2 (Adzhubei et al 2010), that uses Bayesian methods, and; 3) Automated Splice Site And Exon Definition Analyses (ASSEDA), a system that evaluate changes in splice site strength based on information theory-based models (<http://splice.uwo.ca/>).

Results

The average age of diagnosis was about three and a half months, with exception of a 48 years old patient. During the review of patients' records and analyzing the standardized form data of patients from other participating centers, it was observed as the main clinical findings: hepatomegaly, jaundice, hemolytic anemia, failure to thrive and bilateral cataract. Some patients shows developmental delay and the only adult patient included have primary ovarian insufficiency (Table 1).

DNA sequencing analysis identified 18 different pathogenic mutations on the *GALT* gene (Table 2), the two with higher relative allelic frequency were the c.563A>G[p.Q188R] (22%) and c.404C>T[p.S135L] (12%). We also identified the Duarte allele and seven new mutations: c.2T>C[p.M1T], c.97C>A[p.R33S], c.217C>T[p.P73S], c.287_289delACA[p.N97del], c.328+1G>A[IVS3+1G>A], c.377+4A>C[IVS4+4A>C] and c.506A>C[p.Q169P] (Figure 1), and six of them were in heterozygous with the frequent mutations detected in our study (IVS3+1G>A/p.Q188R, IVS4+4A>C/p.Q188R, p.M1T/p.S135L, p.M1T/p.Q188R, p.P73S/p.N314D, p.N97del/p.N314D and p.Q169P/p.Q188R). Patients who carried new mutations showed reduced or undetectable GALT enzyme activity (Table 1).

Four patients were genotyping as homozygous for the allele p.Q188R, one patient was heterozygous for wild type and p.P325L allele and three were heterozygous for a CG mutation with predicted silent mutations (p.H132Y/p.T292T+p.H315H, p.R33S/p.S293S and p.I170I/p.Q188R). The majority of the patients (22) were genotyping as compound heterozygotes for two of the following mutations: p.M1T, p.R33H, p.P73S, p.N97del, IVS3+1G>A, IVS4+4A>C, p.S135L, p.Q169P, p.F171S, p.G175D, p.Q188R, p.R204X, p.R231H, p.L275Qfs*5, p.K285N, p.N314D and p.P325L (Table 1).

Interestingly, a patient who has been identified by neonatal screening with high total galactose level had normal GALT activity assay and no mutation in the coding region of *GALT* gene. Further analysis revealed that the patient had type II galactosemia, caused by two mutations in *GALK1* gene: c.166-5_c.227dup67 and p.R256W (Figure 2).

Discussion

In order to characterize the molecular basis of the galactosemia in Brazil, we analyzed samples from 30 patients suspected to have galactosemia. The results revealed 26 different *GALT* mutations and two on the *GALK1* gene, with an average rate of pathogenic alleles detection of 93%. The p.Q188R mutation was the most frequent (22%), followed by the p.S135L (12%) and the Duarte allele (8%). The mutation p.M1T was found in three alleles, including a pair of brothers, and IVS4+4A>C, p.G175D and p.R204X were identified in two alleles each, with p.R204X also present in brothers. The mutations p.M1T, p.R33S, p.P73S, p.N97del, IVS3+1G>A, IVS4+4A>C and p.Q169P identified in this study have never been described previously.

Regarding the phenotype, it was observed a broad clinical spectrum, ranging from a rapidly progressive phenotype with hepatic failure that result in death in the third month of life, to more slowly progressive forms, in which were observed only mild hepatomegaly.

For patients who received the diagnosis after a specific clinical situation, it was possible to establish a genotype-phenotype correlation. Patients who were homozygous for the p.Q188R mutation presented more severe phenotype, as well as the patient with undetectable GALT activity who is compound heterozygous for the mutation p.Q188R and new one p.Q169P. Both mutations are in the highly conserved domain on exon 6 (Leslie et al 1992; Lai et al 1999). The p.Q188R mutation is more common in European populations or those predominantly of European origin (Tyfield et al 2000). Individuals homozygous for p.Q188R allele tend to have a severe phenotype and a great loss of enzyme activity, as observed in *in vitro* expression systems (Reichardt et al 1991, Coelho et al 2014).

The compound heterozygous patient for mutations p.Q188R and IVS3+1G>A also showed a severe phenotype, progressing to cirrhosis before starting treatment. She had a history of a sister who died of liver failure at two months of age of unknown cause. We postulate that the single base change G-to-A that corresponds to a change in the 5'-GU splice donor site of Intron 3 makes the site unrecognizable to the splicing enzymes, with a consequent excision of the exon 3 in the mRNA and production of a truncated protein. It is exactly what happens, for example, with the common mutation of Phenylketonuria IVS12+1G>A, that causes skipping of the 12th exon when RNA is being spliced (Marvit et al 1987).

The proband who had the mutations p.M1T and p.S135L, at the age of two months, showed anemia, hepatomegaly, bilateral cataracts and ascites, progressing in a month to hepatic failure, dehydration and hepatic encephalopathy. She was diagnosed with CG, but was at a so severe clinical status that died due to septic shock, shortly after starting the diet. Her brother, who was born one year after, was diagnosed within the first month of life and began the treatment early. He is currently 5 years old and shows a good clinical outcome, presenting only with a slight enlarged liver and mild bilateral nuclear cataract, which can be attributed to a low compliance to diet. The p.M1T mutation was also found in heterozygous with p.Q188R in a patient with classic severe phenotype, which was diagnosed soon after birth.

The p.M1T should be considered a severe mutation because affects the start codon and might cause out-of-frame usage of the next AUG triplet, 112 nucleotides downstream; it is therefore expected to produce an unstable nonfunctional protein. So the fact that it was considered benign by polyphen-2 although pathogenic by SIFT may be because the polyphen-2 consider structural change that the mutation causes to the protein and does not take into account the fact that the protein is truncated.

Other individuals with a p.S135L mutation had a moderate phenotype, which was consistent with what is described in the literature. The p.L135 allele is found almost exclusively in people of African descent and individuals carrying this allele have residual enzyme activity of GALT in some tissues and a less severe phenotype (Lai et al 1996; Manga et al 1999).

The only adult patient included in this study was a 48 years woman, presenting with a primary ovarian insufficiency, ataxia and a moderate residual GALT enzyme activity. She had no other symptoms and during the genotyping only the missense new mutation p.R33S and the mutation/polymorphism p.S293S were detected.

Two unrelated patients from different geographical regions of Brazil have the IVS4+4A>C mutation, predicted to be pathogenic by ASSEDA. One is a compound heterozygote with the p.Q188R mutation, and the other with the p.R231H mutation. Both showed a good clinical outcome. The first was diagnosed through expanded neonatal screening test and therefore started treatment early. The second one was with jaundice and hepatomegaly at 15 days of age and was diagnosed a month later, when in addition, he presented cataracts. The p.R231H mutation was first described in a Japanese patient, it is predicted to reduce to 15% of normal controls the GALT enzyme activity in a COS cell expression system (Ashino et al 1995) and has no detectable activity when expressed in *E. coli* BL21 cells (Coelho et al 2014), as observed in this patient.

The most common variant of the gene is the Duarte (D2) allele, that is generally not associated with a clinical phenotype when in homozygous, and when in heterozygous with a disease-causing mutation can trigger a mild form of galactosemia called Duarte galactosemia (Elsas et al 1994). In this study, six Duarte alleles have been identified (10%). All individuals with Duarte galactosemia, except one, were diagnosed through expanded newborn screening test, including the compound heterozygotes D2/p.P73S and D2/p.N97del.

The p.P73S mutation is considered tolerable in SIFT and probably damaging by the Poliphen-2. This individual is asymptomatic, even without diet restriction and despite the low enzymatic activity, therefore it is not possible to establish whether this new mutation is pathogenic or not, additional functional studies are necessary.

The only patient with Duarte galactosemia who was diagnosed after a clinical suspicion, is compound heterozygote D2/p.G175D and had only prolonged neonatal jaundice. This patient has an enzyme assay below the normal range and was in a galactose restriction diet.

Genetic heterogeneity documented to date, undoubtedly contributes to the phenotypic heterogeneity that is observed in galactosemia. Additional effects of non-allelic variation and other constitutional factors on phenotypic variability remain to be elucidated. The present study characterized the phenotypic and genotypic profile of some patients with classic galactosemia in the Brazilian population, which is considered one of the most heterogeneous in the world, as a result of more than five centuries of miscegenation among mainly three ancestral roots: the indigenous Amerindians, Europeans and sub-Saharan Africans. The heterogeneity and admixture have important implications in the current genetic background of the population (Carvalho-Silva et al 2001; Callegari-Jacques et al 2003), that have a high estimated prevalence of CG compared with other populations (Camelo Jr et al 2009). This is the first genotyping study in Brazilian patients with diagnosis of galactosemia.

Conflict of interest

The authors have no conflicts of interest to declare.

Acknowledgments

The authors gratefully acknowledge the cooperation of patients and parents, the physicians who provided patients' clinical data and samples, and laboratory colleagues, as follow: Dr. José Eduardo Goes; Dr. Fernando Regla Vargas; Dra. Maria Angélica Lima; Dra. Carolina Araújo Moreno; Dra. Nancy Cordovani; Dr. Hector Yuri Conti Wanderley; Dr. Ruy Pires de Oliveira Sobrinho; Diana Ruffato Resende Campanholi; Cristiane Ayres; Ane Dinarte.

References

Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L et al (2010) A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods* 7(4):248-249

Ashino J, Okano Y, Suyama I et al (1995) Molecular characterization of galactosemia (type 1) mutations in Japanese. *Hum Mutat* 6(1):36-43

Berry GT, Leslie N, Reynolds R et al (2001) Evidence for alternate galactose oxidation in a patient with deletion of the galactose-1-phosphate uridylyltransferase gene. *Mol Genet Metab* 72(4):316-21.

Bosch AM (2006) Classical galactosaemia revisited. *J Inherit Metab Dis* 29(4):516-25

Calderon FR, Phansalkar AR, Crockett DK, Miller M, Mao R (2007) Mutation database for the galactose-1-phosphate uridylyltransferase (GALT) gene. *Hum Mutat* 28(10):939-43 [cited 2017 03/31/2014]; Available from: http://www.arup.utah.edu/database/GALT/GALT_display.php

Callegari-Jacques SM, Grattapaglia D, Salzano FM et al (2003) Historical genetics: spatiotemporal analysis of the formation of the Brazilian population. *Am J Hum Biol* 15(6):824-34

Camelo JS Jr, Fernandes MI, Maciel LM et al (2009) Galactosaemia in a Brazilian population: High incidence and cost-benefit analysis. *J Inherit Metab Dis* 32 Suppl 1:S141-9 Online Report #8

Carvalho-Silva DR, Santos FR, Rocha J, Pena SD (2001) The phylogeography of Brazilian Y-chromosome lineages. *Am J Hum Genet* 68(1):281-6

Coelho AI, Trabuco M, Ramos R et al (2014) Functional and structural impact of the most prevalent missense mutations in classic galactosemia. *Mol Genet Genomic Med* 2(6):484-496

Dahlqvist A (1971) A fluorometric method for the assay of galactose-1 phosphate in red blood cells. *J Lab Clin Med* 78: 931–938

Elsas LJ, Dembure PP, Langley SD, Paulk EM, Hjelm LN, Fridovich-Keil JL (1994) A common mutation associated with the Duarte galactosemia allele. *Am J Hum Genet* 54, 1030–1036

Elsas LJ, Lai K (1998) The molecular biology of galactosemia. *Genet Med* 1(1):40-8.

Gort L, Boleda MD, Tyfield L et al (2006) Mutational spectrum of classical galactosaemia in Spain and Portugal. *J Inherit Metab Dis* 29(6):739-42.

Greber-Platzer S, Guldberg P, Scheibenreiter S et al (1997) Molecular heterogeneity of classical and Duarte galactosemia: mutation analysis by denaturing gradient gel electrophoresis. *Hum Mutat* 10(1):49-57

Gubbels CS, Welt CK, Dumoulin JC et al (2013) The male reproductive system in classic galactosemia: cryptorchidism and low semen volume. *J Inherit Metab Dis* 36(5):779-86

Hennermann JB, Schadewaldt P, Vetter B et al (2011) Features and outcome of galactokinase deficiency in children diagnosed by newborn screening. *J Inherit Metab Dis* 34(2):399–407

Holden HM, Rayment I, Thoden JB (2003) Structure and function of enzymes of the Leloir pathway for galactose metabolism. *J Biol Chem* 278(45):43885-8

Holton JB, Walter JH, Tyfield LA (2001) Galactosemia [Chapter 72]. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. Childs B, Kinzler KW, Vogelstein B, assoc. eds. The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease. 8th ed. New York: McGraw-Hill p1553-1588

Kalckar HM, Anderson EP, Isselbacher KJ (1956) Galactosemia, a Congenital Defect in a Nucleotide Transferase: a Preliminary Report. *PNAS USA* 42(2):49-51

Kaufman FR, Reichardt JK, Ng WG et al (1994) Correlation of cognitive, neurologic, and ovarian outcome with the Q188R mutation of the galactose-1-phosphate uridylyltransferase gene. *J Pediatr* 125(2):225-7

Kozak L, Francova H (1999) Presence of a deletion in the 50 upstream region of the GALT gene in Duarte (D2) alleles. *J Med Genet* 36, 576–578

Kozak L, Francova H, Fajkusova L et al (2000) Mutation analysis of the GALT gene in Czech and Slovak galactosemia populations: identification of six novel mutations, including a stop codon mutation (X380R). *Hum Mutat* 15(2):206.

Kumar P, Henikoff S, Ng PC (2009) Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nat Protoc* 4(7):1073–81

Lai K, Langley SD, Singh RH, Dembure PP, Hjelm LN, Elsas LJ (1996) A prevalent mutation for galactosemia among black Americans. *J Pediatr* 128(1):89–95

Lai K, Willis AC, Elsas LJ (1999) The biochemical role of glutamine 188 in human galactose-1-phosphate uridylyltransferase. *J Biol Chem* 274(10):6559–66

Leloir LF, Cardini CE (1957) Biosynthesis of Glycogen from Uridine Diphosphate Glucose. *J Am Chem Soc* 79: 6340

Leslie ND, Immerman EB, Flach JE, Florez M, Fridovich-Keil JL, Elsas LJ (1992) The human galactose-1-phosphate uridylyltransferase gene. *Genomics* 14(2):474–480

Manga N, Jenkins T, Jackson H, Whittaker DA, Lane AB (1999) The molecular basis of transferase galactosaemia in South African negroids. *J Inherit Metab Dis* 22(1):37–42

Marvit J, DiLella A, Brayton K, Ledley F, Robson K, Woo S (1987) GT to AT transition at a splice donor site causes skipping of preceding exon in phenylketonuria. *Nucl Acids Res* 15: 5613–5628

Nelson D (1995) Verbal dyspraxia in children with galactosemia. *Eur J Pediatr* 154 (suppl 2): s6–7

Reichardt JK (1992) Genetic basis of galactosemia. *Hum Mutat.* 1(3):190–6

Reichardt JK, Berg P (1988) Cloning and characterization of a cDNA encoding human galactose-1-phosphate uridyl transferase. *Mol Biol Med* 5:107–122

Reichardt JK, Levy HL, Woo SL (1992) Molecular characterization of two galactosemia mutations and one polymorphism: implications for structure-function analysis of human galactose-1-phosphate uridylyltransferase. *Biochemistry.* 23;31(24):5430–3

Reichardt JK, Packman S, Woo SL (1991) Molecular characterization of two galactosemia mutations: correlation of mutations with highly conserved domains in galactose-1-phosphate uridyl transferase. *Am J Hum Genet* 49(4): 860–867

Reichardt JK, Woo SL (1991) Molecular basis of galactosemia: mutations and polymorphisms in the gene encoding human galactose-1-phosphate uridylyltransferase. *Proc Natl Acad Sci* 88(7):2633–7.

Ridel KR, Leslie ND, Gilbert DL (2005) An updated review of the long-term neurological effects of galactosemia. *Pediatr Neurol* 33(3):153–61

Schweitzer S, Shin Y, Jacobs C, Brodehl J (1993) Long-term outcome in 134 patients with galactosaemia. *Eur J Paediatr* 152: 36–43

Shih L, Suslak L, Rosin I, Searle B, Desposito F (1984) Gene dosage studies supporting localization of the structural gene for galactose-1-phosphate uridylyltransferase (GALT) to band p13 of chromosome 9. *Am J Med Genet* 19:539–543

Shin YS, Koch HG, Kohler M, Hoffmann G, Patsoura A, Podskarbi T (1998) Duarte-1 (Los Angeles) and Duarte-2 (Duarte) variants in Germany: two new mutations in the GALT gene which cause a GALT activity decrease by 40–50% of normal in red cells. *J Inherit Metab Dis* 21, 232–235

Timson DJ (2006) The structural and molecular biology of type III galactosemia. *IUBMB Life*. 58(2):83-9.

Tyfield LA (2000) Galactosaemia and allelic variation at the galactose-1-phosphate uridylyltransferase gene: a complex relationship between genotype and phenotype. *Eur J Pediatr* 159 Suppl 3:S204-7

Tyfield L, Reichardt J, Fridovich-Keil J et al (1999) Classical galactosemia and mutations at the galactose-1-phosphate uridylyltransferase (GALT) gene. *Hum Mutat* 13: 417-430

Waggoner DD, Buist NRM, Donnell GN (1990) Long-term prognosis in galactosemia: results of a survey of 350 cases. *J Inherit Metab Dis* 13: 802–818

Table legends

Table 1.

Clinical summary of patients with galactosemia and results of GALT enzyme activity assay and *GALT* genotyping

Table 2.

Variations identified in the *GALT* gene on Brazilian patients with galactosemia and result of *in silico* analysis

Figures legends

Figure 1

Electropherograms of the novel *GALT* mutations identified in this study: M1T, heterozygous T-to-C transition at c.2 in exon 1; IVS 3+1, heterozygous G-to-A transition at c.328+1 in intron 3; R33S, heterozygous C-to-A transversion at c.97 in exon 2; IVS4+4, heterozygous A-to-C transversion at c.377+4 in intron 4; P73S, heterozygous C-to-T transition at c.117 in exon 2; Q169P, heterozygous A-to-C transversion at c.506 in exon 5.

Figure 2

Electropherograms of the *GALK1* mutations identified in the patient with galactosemia type II: heterozygous duplication of 67 bases from c.166-5 to c.227, that spans the intron 1/exon 2 boundary, and the R256W mutation, a heterozygous C-to-T transition at c.766 in exon 5.

Table 1.

Patients	Age at diagnosis	Hepatomegaly	Jaundice	Vomiting	Failure to thrive	Cataracts	Hemolytic anemia	Ataxia/Ovarian failure	GALT activity (μmol/h/g Hb)	GALT Genotype	Diagnosis
1	2m	+	+	+	+	-	+	-	Undetectable	Q188R/Q188R	Classical galactosemia
2	3m	+	-	-	-	-	-	-	7.0	H132Y/T292T+H315H	Galactosemia allele carrier
3	2m	+	-	+	+	-	-	-	Undetectable	S135L/Q188R	Classical galactosemia
4	1½m	+	+	-	+	-	-	-	11.0	IVS3nt+1G>A /Q188R	Classical galactosemia
5	4½m	+	+	-	-	+	+	-	Undetectable	S135L/K285N	Classical galactosemia
6*	2m	+	+	-	+	+	-	-	1.5	M1T /S135L	Classical galactosemia
7@	NS	-	-	-	-	-	-	-	47.0	WT/WT	Galactosemia type 2
8	2m	+	+	+	+	-	-	-	5.0	Q188R/Q188R	Classical galactosemia
9	2m	-	-	-	-	-	-	-	Not available	WT/P325L	Galactosemia allele carrier
10	NS	-	-	-	-	-	-	-	3.0	P73S /N314D	Duarte galactosemia
11#	NS	-	-	-	-	-	-	-	13.0	R204X/N314D	Duarte galactosemia
12#	NS	-	-	-	-	-	-	-	19.0	R204X/N314D	Duarte galactosemia
13	48y	-	-	-	-	-	-	+	21.0	R33S /S293S	Galactosemia allele carrier
14*	30m	+	-	-	+	-	+	-	1.0	M1T /S135L	Classical galactosemia
15	NS	-	+	-	+	-	+	-	Undetectable	S135L/G175D	Classical galactosemia
16	1m	+	+	+	+	-	-	-	Undetectable	Q169P /Q188R	Classical galactosemia
17	1m	+	+	+	-	+	-	-	Undetectable	S135L/Q188R	Classical galactosemia
18	3m	+	-	+	+	-	-	-	Undetectable	S135L/F171S	Classical galactosemia
19	NS	-	-	-	-	-	-	-	13.0	I170I/Q188R	Galactosemia allele carrier
20	3m	+	+	+	+	-	-	-	12.0	R33H/S135L	Classical galactosemia
21	1m	+	+	-	-	-	-	-	3.1	Q188R/Q188R	Classical galactosemia
22	...	-	+	-	-	-	-	-	10.0	G175D/N314D	Duarte galactosemia
23	4m	+	+	-	-	-	-	-	1.5	Q188R/Q188R	Classical galactosemia
24	1½m	+	+	+	+	+	+	-	Undetectable	IVSnt4+4A>C /R231H	Classical galactosemia
25	NS	-	-	-	-	-	-	-	29.0	Q188R/N314D	Duarte galactosemia
26	NS	-	+	-	+	-	-	-	13.3	IVS4nt+4A>C /Q188R	Classical galactosemia
27	2m	+	+	-	+	-	-	-	Undetectable	S135L/L275fs	Classical galactosemia
28	NS	-	-	-	-	-	-	-	29.8	N97del /N314D	Duarte galactosemia
29	½m	+	+	+	+	-	-	-	Undetectable	M1T /Q188R	Classical galactosemia
30	1m	+	+	+	-	+	-	-	14.5	Q188R/K285N	Classical galactosemia

NS = Newborn screening; m = months; y = years; *sib pair, #sib pair
 @GALK1 genotype: c.166-5_c.227dup67 and c.766C>T (p.R256W)
 New mutations are indicated in bold

Table 2.

Region	nucleotide change	Mutation type	Amino Acid	Damage Prediction by SIFT	Damage Prediction by Polyphen-2	Classification	Relative allele frequency	References
5'UTR	-119_-116delCAGT*	deletion	---	---	---	Benign (Duarte 2)	0,10	Berry GT et al., 2001
Exon 1	c.2T>C	missense	M1T	DAMAGING	TOLERATED	Pathogenic	0,05	novel
Exon 2	c.97C>A	missense	R33S	DAMAGING	DAMAGING	Pathogenic	0,02	novel
Exon 2	c.98G>A	missense	R33H	DAMAGING	DAMAGING	Pathogenic	0,02	Gort L et al., 2006
Exon 2	c.217C>T	missense	P73S	TOLERATED	DAMAGING	Predicted pathogenicity	0,02	novel
Exon 3	c.287_289delACA	deletion	N97del	---	---	Pathogenic	0,02	novel
Intron 3	c.328+1G>A	splicing effect#	---	---	---	Predicted pathogenicity	0,02	novel
Intron 4	c.377+4A>C	splicing effect#	---	---	---	Predicted pathogenicity	0,03	novel
Exon 5	c.394C>T	missense	H132Y	DAMAGING	DAMAGING	Pathogenic	0,02	Elsas LJ et al., 1998
Exon 5	c.404C>T	missense	S135L	DAMAGING	DAMAGING	Pathogenic	0,15	Reichardt JK et al., 1992
Exon 5	c.506A>C	missense	Q169P	DAMAGING	DAMAGING	Pathogenic	0,02	novel
Intron 5	c.508-24G>A*	polymorphism	---	---	---	Benign	0,10	Kozak L et al., 2000
Intron 5	c.507+62G>A*	polymorphism	---	---	---	Benign	0,10	Kozak L et al., 2000
Exon 6	c.510C>A	silent	I170I	TOLERATED	TOLERATED	Benign	0,02	Item C et al., 2002
Exon 6	c.512T>C	missense	F171S	DAMAGING	DAMAGING	Pathogenic	0,02	Reichardt JK et al., 1992
Exon 6	c.524G>A	missense	G175D	DAMAGING	DAMAGING	Pathogenic	0,03	Gort L et al, 2006
Exon 6	c.563A>G	missense	Q188R	DAMAGING	DAMAGING	Pathogenic	0,28	Reichardt JK et al., 1992
Exon 7	c.610C>T	nonsense	R204X	---	---	Pathogenic	0,03	Tyfield L et al., 1999
Exon 8	c.692G>A	missense	R231H	DAMAGING	DAMAGING	Pathogenic	0,02	Ashino J et al., 1995
Exon 9	c.824delT	deletion	L275Qfs*5	---	---	Pathogenic	0,02	Elsas LJ et al., 1998
Exon 9	c.855G>T	missense	K285N	DAMAGING	DAMAGING	Pathogenic	0,03	Leslie ND et al., 1992
Exon 9	c.876G>A	silent	T292T	TOLERATED	TOLERATED	Benign	0,03	Calderon FR et al., 2007
Exon 9	c.879C>T	silent	S293S	TOLERATED	TOLERATED	Benign	0,02	Calderon FR et al., 2007
Exon 10	c.940A>G*	missense	N314D	TOLERATED	TOLERATED	Benign (Duarte 1 and 2)	0,10	Reichardt JK et al., 1991
Exon 10	c.945T>C	silent	H315H	TOLERATED	TOLERATED	Benign	0,03	Lai K et al., 1996
Exon 10	c.974C>T	missense	P325L	DAMAGING	DAMAGING	Pathogenic	0,02	Greber-Platzer S et al., 1997

* these mutations are found in cis in Duarte 2 allele
 New mutations are indicated in bold

Figure 1

Figure 2

Supplemental material S1

All PCR reactions were standardized with the following conditions: 2.5 mM of each primer, 2.5 mM of dNTPs, 2.5 μ L of 1x buffer (Biotools), 1U of Taq polymerase (Biotools); 200 ng of genomic DNA, and 14 μ L of distilled water, in a final reaction volume of 25 μ L. PCR was performed as follows: an initial denaturation step of 4 min, followed by 35 cycles consisting of 40 s at 94 °C (denaturation), 50 s at annealing temperatures (specific for each reaction) (Table 2), an extension of 50 s at 72 °C, and a final extension of 10 min at 72 °C.

Table S1-a: Primer sequences and product sizes for PCRs of *GALT* gene.

Primer	Primer sequence	Amplicon lenght
GALT_EX1_F	TGAAGTAGGATCATCAATGTCCG	413bp
GALT_EX1_R	GCAGACTGTACGCCTTGTCTG	
GALT_EX2_F	AGACCGACAAGGCGTACAGT	471bp
GALT_EX2_R	TGACCCAGAAGGAGGTTTAC	
GALT_EX3/4_F	GCCTTCCCTACTCCCTTGTAG	371bp
GALT_EX3/4_R	CCCAATGCTGAGTCTCCAAC	
GALT_EX5/6_F	GTTGGAGACTCAGCATTGGG	536bp
GALT_EX5/6_R	CCACATCATTGGCATATTTCC	
GALT_EX7_F	GTTTCTTGGCTGAGTCTGAGC	440bp
GALT_EX7_R	CCACTAACCACCCGAGTCTAAG	
GALT_EX8/9_F	GGTGAGAAGACATCAGATCCTG	531bp
GALT_EX8/9_R	GGCTTGCTCCTTTGAGGTT	
GALT_EX10_F	GTGCTTTCTAATCTCCTGCCAG	432bp
GALT_EX10_R	CAGTCCCTTCCTGCCAGAG	
GALT_EX11_F	CCTCCTTAATTGCTCCCTGTC	461bp
GALT_EX11_R	CCTAAACTGGGAATGCTGTCA	

Table S1-b: Primer sequences and product sizes for PCRs of *GALK1* gene.

Primer	Primer sequence	Amplicon lenght
GALK1_EX1_F	TCATTGGTTCTTCCCGAAGT	615bp
GALK1_EX1_R	CTTCCAACGTGGGGAACAG	
GALK1_EX2_F	GCAGTGTCATTGGAGAGGCT	355bp
GALK1_EX2_R	CCTTCCCCACAGTGTATCAGA	
GALK1_EX3_F	GGTTGGTGGCTTCTGACAAT	450bp
GALK1_EX3_R	CAGCTATTGTGCCCGAGTCT	
GALK1_EX4/5_F	CTGGAGTGTCATTGAAGCCA	642bp
GALK1_EX4/5_R	TTGAAGGGACTGGGGAGAG	
GALK1_EX6/7_F	GGCTGCTGACTCCTCTTTCC	276bp
GALK1_EX6/7_R	GCAGCTCACCTCATAGTCGTCT	
GALK1_EX8_F	CTGTGCCTGGGGTTTATGG	412bp
GALK1_EX8_R	CCAAGCATACACCCACCTCT	

Supplemental material S2

Results of *In silico* analysis

Table S2-a: Results of SIFT simulations

User input Coordinates	Codons	Transcript ID	Substitution	Region	dbSNP ID	SNP/Mutation Type	Prediction	SIFT Score	Median Information Content
9,34646703,1,T/C	ATG-AcG	ENST00000378842	M1T	EXON CDS	novel	Nonsynonymous	DAMAGING *Warning! Low confidence.	0	3.45
9,34647100,1,C/A	CGC-aGC	ENST00000378842	R33S	EXON CDS	novel	Nonsynonymous	DAMAGING	0	2.98
9,34647101,1,G/A	CGC-CaC	ENST00000378842	R33H	EXON CDS	rs111033829:A	Nonsynonymous	DAMAGING	0	2.98
9,34647220,1,C/T	CCT-iCT	ENST00000378842	P73S	EXON CDS	novel	Nonsynonymous	TOLERATED	0.12	3.01
9,34647241,1,C/T	CGA-tGA	ENST00000378842	R80*	EXON CDS	rs111033664:T	Nonsense	N/A	N/A	N/A
9,34647845,1,C/T	CAC-iAC	ENST00000378842	H132Y	EXON CDS	rs111033688:T	Nonsynonymous	DAMAGING	0.01	3.01
9,34647855,1,C/T	TCG-TrG	ENST00000378842	S135L	EXON CDS	rs111033690:T	Nonsynonymous	DAMAGING	0.02	3.01
9,34647957,1,A/C	CAG-CcG	ENST00000378842	Q169P	EXON CDS	novel	Nonsynonymous	DAMAGING	0	3.01
9,34648114,1,C/A	ATC-Ata	ENST00000378842	I170I	EXON CDS	rs61735984:A	Synonymous	TOLERATED	1	3.01
9,34648116,1,T/C	TTT-TcT	ENST00000378842	F171S	EXON CDS	rs111033715:C	Nonsynonymous	DAMAGING	0	3.01
9,34648128,1,G/A	GGT-GaT	ENST00000378842	G175D	EXON CDS	rs111033718:A	Nonsynonymous	DAMAGING	0	3.01
9,34648167,1,A/G	CAG-CgG	ENST00000378842	Q188R	EXON CDS	rs75391579:G	Nonsynonymous	DAMAGING	0	3.01
9,34648376,1,C/T	CGA-tGA	ENST00000378842	R204*	EXON CDS	rs111033737:T	Nonsense	N/A	N/A	N/A
9,34648763,1,G/A	CGT-CaT	ENST00000378842	R231H	EXON CDS	rs111033754:A	Nonsynonymous	DAMAGING	0	3.01
9,34648998,T,.		ENST00000378842	L275fs	EXON CDS	rs111033777	Frameshift	N/A	N/A	N/A
9,34649029,1,G/T	AAG-AAt	ENST00000378842	K285N	EXON CDS	rs111033773:T	Nonsynonymous	DAMAGING	0	3.01
9,34649050,1,G/A	ACG-Aca	ENST00000378842	T292T	EXON CDS	rs1055607:A	Synonymous	TOLERATED	1	3.01
9,34649053,1,C/T	TCC-TCt	ENST00000378842	S293S	EXON CDS	rs15527942:T	Synonymous	TOLERATED	1	3.01
9,34649442,1,A/G	AAC-gAC	ENST00000378842	N314D	EXON CDS	rs2070074:G	Nonsynonymous	TOLERATED	1	3.01
9,34649447,1,T/C	CAT-CAc	ENST00000378842	H315H	EXON CDS	rs61735982:C	Synonymous	TOLERATED	1	3
9,34649476,1,C/T	CCG-CiG	ENST00000378842	P325L	EXON CDS	rs111033794:T	Nonsynonymous	DAMAGING	0	3.01

Table S2-b: Results of Poliphen-2 simulations

Substitution	Protein Acc	Prediction	Score	sensitivity	specificity
M1T #	P07902	BENIGN	0.00	1.00	0.00
R33S #	P07902	PROBABLY DAMAGING	1.00	0.00	1.00
R33H	P07902	PROBABLY DAMAGING	1.00	0.00	1.00
P73S #	P07902	PROBABLY DAMAGING	0.996	0.55	0.98
H132Y	P07902	POSSIBLY DAMAGING	0.685	0.86	0.92
S135L	P07902	POSSIBLY DAMAGING	0.940	0.80	0.94
Q169P #	P07902	PROBABLY DAMAGING	0.959	0.78	0.95
F171S	P07902	PROBABLY DAMAGING	1.00	0.00	1.00
G175D	P07902	PROBABLY DAMAGING	1.00	0.00	1.00
Q188R	P07902	PROBABLY DAMAGING	1.00	0.00	1.00
R231H	P07902	PROBABLY DAMAGING	1.00	0.00	1.00
K285N	P07902	PROBABLY DAMAGING	0.996	0.55	0.98
N314D	P07902	BENIGN	0.00	1.00	0.00
P325L	P07902	PROBABLY DAMAGING	1.00	0.00	1.00

novel missense mutations