

ANDRÉ RICARDO MORAES PINHEIRO

ANALISE MOLECULAR DO GENE *GBA* EM PACIENTES COM
GAUCHER, NO ESTADO DO PARÁ

BELÉM

2009

ANDRÉ RICARDO MORAES PINHEIRO

ANALISE MOLECULAR DO GENE *GBA* EM PACIENTES COM
GAUCHER, NO ESTADO DO PARÁ

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Faculdade de Biomedicina da
Universidade Federal do Pará como requisito
parcial para obtenção do grau de Biomédico.
Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos Santana da
Silva. Faculdade de Biomedicina - ICB –
UFPA.

BELÉM

2009

ANDRÉ RICARDO MORAES PINHEIRO

ANALISE MOLECULAR DO GENE *GBA* EM PACIENTES COM
GAUCHER, NO ESTADO DO PARÁ

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Faculdade de Biomedicina da
Universidade Federal do Pará como requisito
para obtenção do grau de Biomédico.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos Santana da Silva

Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo, ICB - UFPA

Avaliador 1: Prof. Dr. Eduardo José Melo dos Santos

Laboratório de Genética Humana e Médica, ICB - UFPA

Avaliador 2: Prof. Dr. Nazário de Souza Messias Júnior

Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo, ICB , UFPA

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, por toda a educação que me foi proporcionada durante a minha vida escolar e acadêmica e pelas oportunidades que me foram dadas.

Ao meu pai em especial, que infelizmente não vai poder presenciar este momento, mas eu sei que era a vontade dele que pelo menos um dos filhos se formasse pela UFPa.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Luiz Santana que após muita insistência minha, me aceitou no laboratório fortalecendo em mim o interesse pela pesquisa e que sempre me ajudou muito me dando oportunidades.

Ao Tio Erik, Clebson e Cadu que me ensinaram as bases para escrever este trabalho me dando dicas e me ensinando qual seria a melhor forma de escrever TCC, resumo, artigo e etc.

Ao Clebinho (gerente), que sempre estava no laboratório disposto a ajudar e sempre foi muito prestativo desde que entrei no laboratório.

Aos colegas de laboratório que vez ou outra sempre me ajudaram, nas mais variadas atividades do LEIM.

Aos meus amigos, que sempre estiveram presentes nos momentos mais difíceis no decorrer do curso.

A Nathalia Lima (Nathalinha), que sempre esteve ao meu lado me incentivando nos momentos mais difíceis e participando direta e indiretamente das minhas atividades acadêmicas.

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA.....	iv
AGRADECIMENTOS.....	v
LISTA DE FIGURAS E TABELAS.....	vii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	x
RESUMO.....	xi
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 DOENÇAS METABÓLICAS HEREDITÁRIAS (DMH).....	1
1.1.1 Incidência e mecanismos de herança.....	2
1.1.2 Classificação.....	2
1.2.3 Doenças de depósito lisossômico.....	2
1.2 DOENÇA DE GAUCHER.....	4
1.2.1 Histórico.....	4
1.2.2 Aspectos bioquímicos.....	4
1.2.3 Manifestações clínicas.....	5
1.2.4 Diagnóstico.....	6
1.2.5 Tratamento.....	6
1.2.6 Aspectos genéticos e moleculares.....	9
1.2.7 Justificativa.....	11
2 OBJETIVOS.....	12
2.1 OBJETIVO GERAL.....	12
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	12
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	13
3.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA.....	13
3.2 ASPECTOS ÉTICOS.....	13
3.3 COLETA E ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS.....	13
3.4 EXTRAÇÃO DE DNA.....	14
3.5 AMPLIFICAÇÃO DO GENE GBA POR REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR).....	14

3.6 ANÁLISE DE DIGESTÃO COM ENDONUCLEASES DE RESTRIÇÃO (RFLP)...	14
3.7 SEQUENCIAMENTO DO DNA E IDENTIFICAÇÃO DE MUTAÇÕES.....	15
4 RESULTADOS.....	16
4.1 ANALISE POR DIGESTÃO COM ENDONUCLEASE DE RESTRIÇÃO.....	16
4.1.1 Detecção da Mutação N370S.....	16
4.1.2 Detecção da Mutação L444P.....	17
4.2 SEQUENCIAMENTO DIRETO.....	18
4.3 FREQUENCIA ALÉLICA E GENOTÍPICA.....	21
5 DISCUSSÃO.....	22
6 CONCLUSÕES.....	25
7 REFERÊNCIAS.....	26
8 ANEXOS.....	30
8.1 ANEXO I: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....	30
8.2 ANEXO II: TERMO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA DA FUNDAÇÃO HEMOPA.....	32

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 01 - Representação esquemática e simplificada dos processos envolvidos em um erro inato do metabolismo (Adaptado de Karam <i>Apud</i> Carakushansky, 2001).....	1
Figura 02 - Rota Metabólica de Degradação dos Esfingolipídios. Adaptado de Glew <i>et al.</i> , 1985.	3
Figura 03 - Glicocerebrosidase é uma β -glicosidase, que hidroliza preferencialmente a Glicosilceramida em glicose e ceramida. A Glicocerebrosidase alternativamente hidroliza a glicosilesfingosina também em glicose e esfingosina (Adaptado de Anthony H. Futerman 2004).....	5
Figura 4. O gene <i>GBA</i> localizado no braço curto do cromossomo 1, locus 21. Figura retirada de http://ghr.nlm.nih.gov/dynamicImages/chromomap/gba.jpeg	8
Figura 5. Estrutura do gene <i>GBA</i> e principais mutações causadoras da DG. Figura retirada da tese de doutorado de Roberto Rozenberg “Análise molecular das doenças de Gaucher e Tay-Sachs no Brasil” São Paulo, 2006.....	8
Figura 6. Representado em lilás o I domínio, em verde o II domínio e em azul o III domínio, o sítio catalítico da enzima está representado em amarelo no centro da enzima.....	10
Figura 7: Detecção da mutação N370S – Eletroforese dos produtos de digestão em gel de agarose 3,0% (p/v). Canaletas M: marcador de peso molecular de 100 pb. Canaletas DG2, DG3, DG5, DG6 e DG10: heterozigoto para mutação N370S. Canaleta DG17: paciente homozigoto para mutação N370S. Canaletas restantes: pacientes DG sem mutação N370S.....	17
Figura 8: Detecção da mutação L444P – Eletroforese dos produtos de digestão em gel de poliacrilamida 15% (p/v). Caneleta M: Marcador molecular de 100pb. Caneleta C: homozigoto normal. Caneleta 1: homozigoto para mutação L444P. Canaletas 2, 3, 5, 11 e 13: heterozigotos para a mutação L444P.....	18
Figura 9: A: alelo selvagem. B: Alteração T369M (C >T).....	19
Figura 10: A: Alelo selvagem. B: Alteração H458Y (C >T).....	20
Tabela 1. Estratégia de detecção das mutações N370S e L444P.....	15

Tabela 2. Frequencia de alelos mutantes encontrados no gene GBA de pacientes com Doença de Gaucher.....	21
Tabela 3. Genótipo encontrado nos 17 indivíduos analisados.....	21

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DMH:	Doenças Metabólicas Hereditárias
DDL:	Doença de Depósito Lisossômico
DG:	Doença de Gaucher
TRE:	Terapia de Reposição Enzimática
PCR:	Reação em Cadeia da Polimerase
RFLP:	Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos de Restrição
N:	Asparagina
S:	Serina
L:	Leucina
P:	Prolina
H:	Histidina
Y:	Tirosina
T:	Treonina
M:	Metionina

RESUMO

A doença de Gaucher (DG) é uma doença metabólica hereditária de padrão de herança autossômica recessiva pertencente ao grupo das esfingolipidoses caracterizada pelo armazenamento de glicocerebrosídeos nos lisossomos. Este acúmulo é decorrente da deficiência da enzima glicocerebrosidase, ou em casos muito raros, pela deficiência de seu co-fator, em consequência ocorre o acúmulo do substrato (glicosilceramida), e outros esfingolipídios nos lisossomos dos macrófagos. A DG é a doença lisossômica de depósito mais freqüente no mundo com uma ocorrência de 1:40.000 nativos. O gene GBA é composto por 11 éxons, localizado na região q21 do cromossomo 1 e é responsável pela codificação da enzima β -glicosidase ácida possuindo mais de 300 mutações já descritas. Os objetivos desse trabalho foram: Identificar mutações nos éxons 8, 9, 10 e 11 do gene GBA em pacientes com DG do estado do Pará e estabelecer a incidência das mesmas na amostra em estudo. Foram coletadas amostras de sangue de 7 pacientes clínicos e bioquimicamente diagnosticados com DG e 10 pais de pacientes, somando um total de 17 indivíduos analisados. Foi realizada extração de DNA e análise posterior através das técnicas de sequenciamento direto e RFLP. A análise das 7 famílias demonstrou uma freqüência alélica de: N370S – 42,85% presente em cinco famílias, L444P - 28,57% presente em três famílias, H419Y - 7,14% presente em uma família e T369M presente em uma família. Nenhum dos pacientes apresentou o mesmo genótipo, evidenciando mais uma vez a heterogeneidade da doença. A mutação H458Y ainda não havia sido descrita na literatura sendo este o primeiro relato de sua aparição em portadores de DG, portanto não há estudos mais aprofundados de seu envolvimento na patogênese da DG, bem como a relação genótipo fenótipo desta mutação.

1. INTRODUÇÃO

1.1. DOENÇAS METABÓLICAS HEREDITÁRIAS (DMH)

As Doenças Metabólicas Hereditárias (DMH) são afecções genéticas que resultam da produção de uma proteína defeituosa. Essa proteína pode atuar no controle de diversas vias metabólicas de transporte, armazenamento, síntese e degradação de substâncias, que são importantes na homeostasia do organismo, (Scriver, 2001).

O bloqueio parcial ou total de uma determinada rota metabólica tem como principais conseqüências: o acúmulo do substrato da enzima deficiente, a deficiência do produto da reação ou o desvio do substrato para uma rota metabólica alternativa que leva o surgimento de manifestações que vão desde a vida fetal até a geriátrica, (Karam *Apud* Carakushansky, 2001).

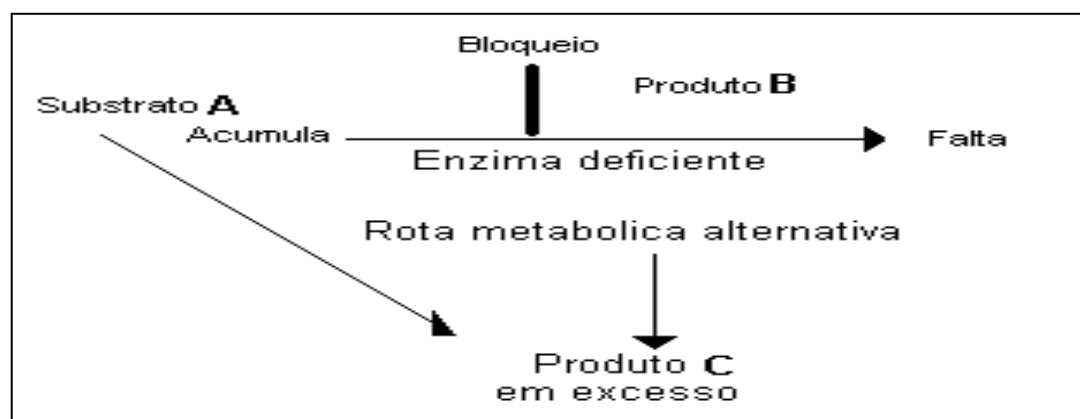


Figura 01 - Representação esquemática e simplificada dos processos envolvidos em um erro inato do metabolismo (Adaptado de Karam *Apud* Carakushansky, 2001).

1.1.1 INCIDÊNCIA E MECANISMO DE HERANÇA.

As DMH, quando avaliadas individualmente são consideradas raras. Entretanto, em virtude do grande número de distúrbios (aproximadamente 600 doenças), as DMH apresentam uma frequência estimada em 1 para 1000 recém-nascidos vivos, (Giugliani, 1997 *Apud* Carakushansky, 2001).

Essas desordens são, na sua maioria, de herança autossômica recessiva (Doença de Gaucher, Tirosinemias, Fenilcetonúria). Há também as doenças de herança dominante (hipercolesterolemia familiar), doença ligada ao X (adrenoleucodistrofia ligada ao X, mucopolissacaridoses tipo II), e doença de herança mitocondrial, (Waber, 1990).

1.1.2 CLASSIFICAÇÃO

As DMH podem ser classificadas de acordo com o resultado metabólico final causado pelo defeito genético em: DMH de moléculas pequenas, ou DMH de moléculas complexas. Esta classificação é útil dada a sua relação com a apresentação clínica, facilitando suspeitas diagnósticas específicas, (Araújo, 2004).

As DMH de moléculas pequenas (aminoacidopatias, acidemias orgânicas, intolerância a açúcares) manifestam-se clinicamente de forma súbita, caracterizando-se por episódios de agudização, em quanto que as DMH de moléculas complexas (doenças peroxissomais, **doenças de depósito lisossômico**) manifestam-se de uma forma crônica e progressiva, atingindo tecidos e órgãos como: fígado, baço, medula óssea e encéfalo, (Wajner 2001).

1.1.3 Doença de depósito lisossômico (DDL)

As Doenças de Depósito lisossômico (DDL) são causadas pela deficiência de uma enzima lisossômica responsável por uma determinada rota catabólica. O resultado da interrupção da rota é o progressivo acúmulo de metabólitos como os esfingolípídeos, (Voet *et al.*, 2004).

Em consequência do acúmulo dos esfingolípídios, o lisossoma aumenta seu volume, ocupa maior espaço intracelular e origina um sub-grupo de DDL denominada doenças de armazenamento de esfingolípídios ou esfingolipidoses (Wilcox, 2004). A figura 2 ilustra a rota de degradação dos esfingolípídios e as doenças relacionadas aos defeitos enzimáticos específicos.

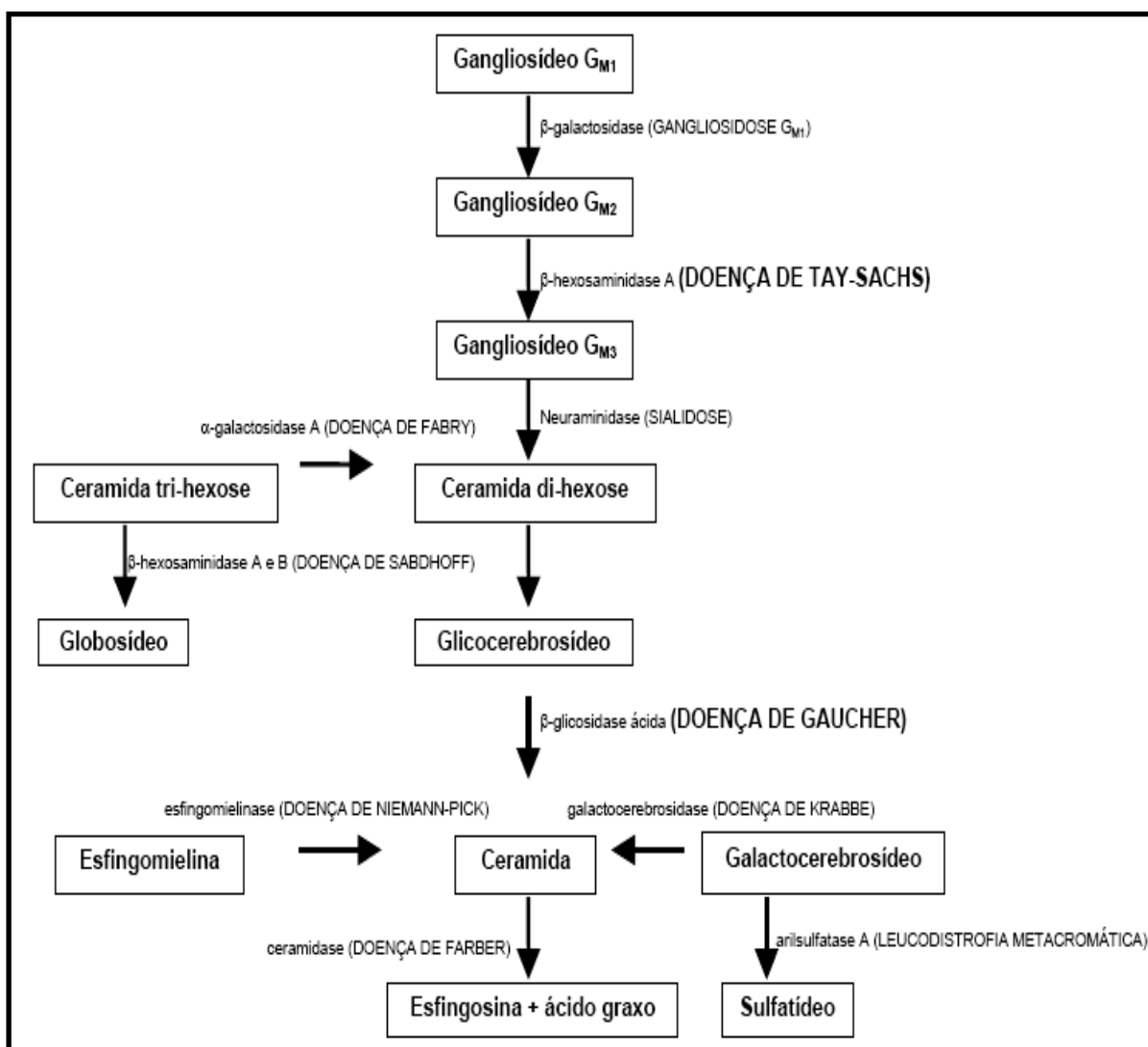


Figura 02: Rota Metabólica de Degradação dos Esfingolípídios. Adaptado de Glew *et al.*, 1985

1.2 DOENÇA DE GAUCHER

1.2.1 Histórico

A doença de Gaucher (DG) é uma doença metabólica hereditária pertencente ao grupo das esfingolipidoses caracterizada pelo armazenamento de glicocerebrosídeos no lisossoma. Este acúmulo se dá devido à deficiência da enzima glicocerebrosidase ou, em casos muito raros, pela deficiência de seu co-fator, SAP C, (Beutler e Grabowski, 2001).

A DG foi descrita primeiramente por Philippe Gaucher em 1882. De 1895 – 1910 as características clínicas da doença foram descritas e sua natureza sistêmica foi reconhecida. (Fried *et al apud*, Scriver 2001) definiram a doença como sendo uma doença autossômica recessiva e somente muitos anos depois foi definido que o gene que codifica a glicocerebrosidase está localizado no braço longo do cromossomo um, (Beutler e Grabowski, 2001).

A DG é a doença lisossômica de depósito mais freqüente no mundo tendo uma ocorrência de 1:40.000 nativos na população em geral. No entanto, estudos epidemiológicos conduzidos nos EUA e Israel mostraram que a incidência dessa desordem em judeus Ashkenazi é significativamente elevada, apresentando uma prevalência de 1:1000 em homozigose e 1:14 em heterozigose nestas populações, (Metha, 2006).

1.2.2. Aspectos Bioquímicos

O defeito enzimático presente na DG (figura 3) tem como consequência o acúmulo do substrato, o glicocerebrosideo (glicosilceramida), e outros esfingolípídios nos lisossomos dos macrófagos que passam a serem chamados de “Células de Gaucher” e, por conseguinte depositam-se principalmente no baço, fígado, medula óssea e pulmões, (Meikle, 2001).

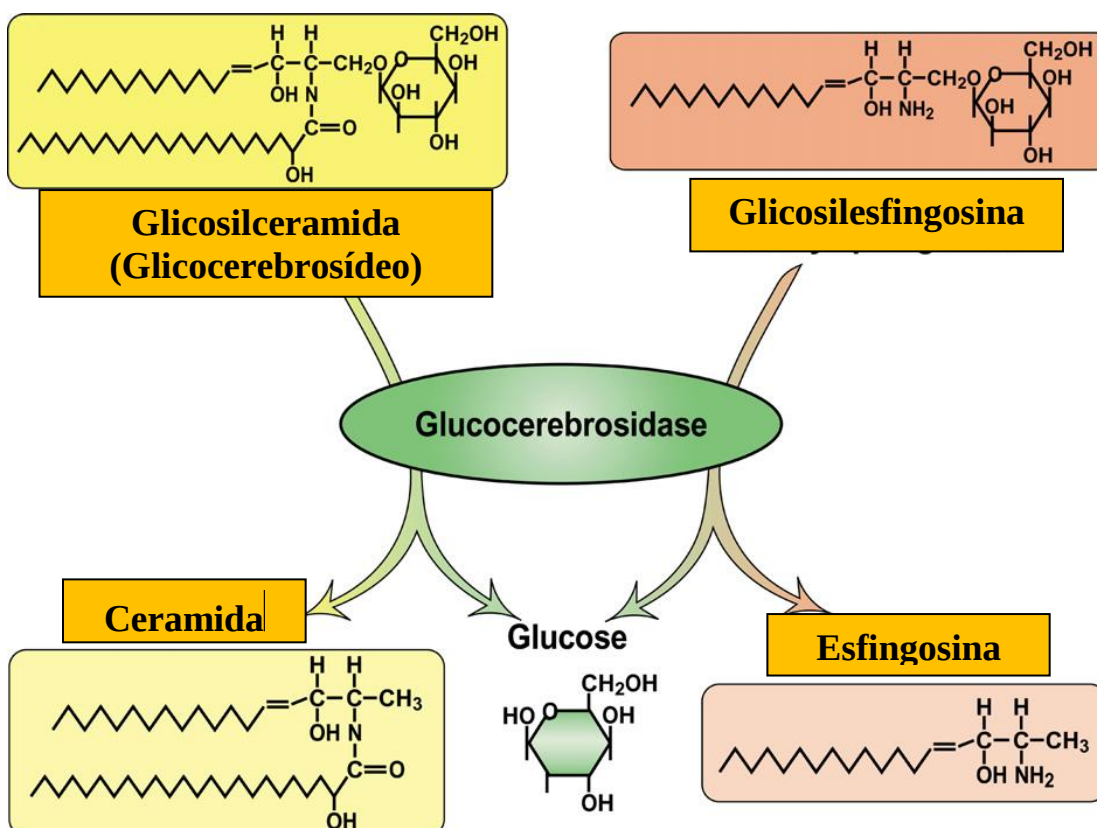


Figura 3. Glicocerebrosidase é uma β -glicosidase, que hidroliza preferencialmente a Glicosilceramida em glicose e ceramida. A Glicocerebrosidase alternativamente hidroliza a glicosilesfingosina também em glicose e esfingosina (Adaptado de Anthony H. Futerman 2004).

1.2.3. Manifestações clínicas

A DG é uma doença multissistêmica, associada com grande variação em suas manifestações clínicas, gravidade e evolução. As manifestações mais comuns são: anemia, leucopenia, trombocitopenia, apnéia, estrabismo, hepatoesplenomegalia e complicações ósseas, (Oliveira *et al*, 2002).

O acometimento pulmonar e envolvimento do sistema nervoso central também são achados importantes, porém menos freqüente, (Barranger *et al* 2001). (Hermann, 2009), salientou que apesar das anomalias viscerais e hematológicas terem a capacidade de levar o paciente a óbito, são as

complicações ósseas, em geral, a causa determinante da morbidade e incapacidade em longo prazo.

Clinicamente a doença de Gaucher possui três tipos, baseado no comprometimento do sistema nervoso central e surgimento dos primeiros sintomas. A fim de evitar descrições inespecíficas, foi adotado um modelo de classificação sendo: tipo um = não neuropático; tipo dois = neuropático; tipo três neuropático subagudo. Entretanto por mais que tente classificar de forma mais precisa, os fenótipos e genótipos podem ser muito heterogêneos, mesmo em grupos de mesma etnia. O tipo um da DG ocorre principalmente em adultos, e segundo dados da Columbia Britânica, 90 a 95% dos pacientes com DG possuem predominantemente o tipo um da doença, (Beutler e Grabowski, 2001).

1.2.4. Diagnóstico

O diagnóstico da doença de Gaucher pode ser feito através da análise da presença das células de Gaucher na medula, entretanto este diagnóstico não é considerado muito preciso devido a presença de células semelhantes em outras desordens como a leucemia, (Beutler e Grabowski, 2001).

A principal forma de diagnóstico da DG é através da análise da atividade enzimática. Em indivíduos com DG a enzima perde a capacidade de clivar o glicocerebrosídeo em glicose e ceramida (Brady *et al*, 1965). Desta forma, a quantificação da atividade de glicocerebrosidase no plasma e no soro é fundamental para o diagnostico definitivo da doença, (Patrick, 1965)

1.2.5. Tratamento

A terapia de reposição enzimática (TRE) tem sido uma alternativa promissora para o tratamento dos pacientes com DG. Desde que aprovada pelo

Food and Drug Administration (FDA) em 1991, ela tem sido administrada em diversos países aos pacientes com essa doença e, na maioria dos casos, resultou em considerável redução da organomegalia e das anormalidades hematológicas. Pacientes tratados com imigluserase, que é a enzima recombinante utilizada na TRE, já na infância adquirem crescimento normal e são menos vulneráveis ao desenvolvimento das lesões ósseas, (Sidransky *et al*, 2006).

Outra forma de tratamento da doença de Gaucher desenvolvida mais recentemente é através do uso de inibidores da síntese de glicosfingolipídeos. Na DG, pequenas moléculas de inibidores derivados de aminoaçúcares, como N-butildeoxinorjímicina, têm sido usadas para reduzir a síntese de glicosilceramida (Cox *et al*. 2000). O miglustat (1,5-(butilimino)-1,5-dideoxi-D-glucitol) é um inibidor que foi lançado no mercado como uma outra forma de tratamento para esses pacientes, inibindo a formação de glicosilceramida, (Sidransky, 2006).

1.2.6. Aspectos Genéticos e Moleculares

A DG é uma desordem genética que apresenta um padrão de herança autossômica recessiva causada, na maioria das vezes, por mutações no gene da β -glicosidase ácida (*GBA*), e raramente, por mutações no gene da pro-saposina (*PSAP*), (Rozenberg *et al.*, 2006).

O gene *GBA* possui aproximadamente 7 Kb e é composto por onze éxons originando um polipeptídio maduro de 497 aminoácidos, localizado na região q21 do cromossomo um e é responsável pela codificação da enzima β -glicosidase ácida, como demonstra a figura 4. Enquanto que o gene *PSAP* possui quinze éxons, está localizado na região q21-23 do cromossomo dez e é responsável pela codificação da pro-saposina, a qual posteriormente sofre proteólise originando quatro proteínas, entre as quais, a saposina C, a qual funcional como cofator da β -glicosidase ácida, (Hruska *et al.*, 2008).

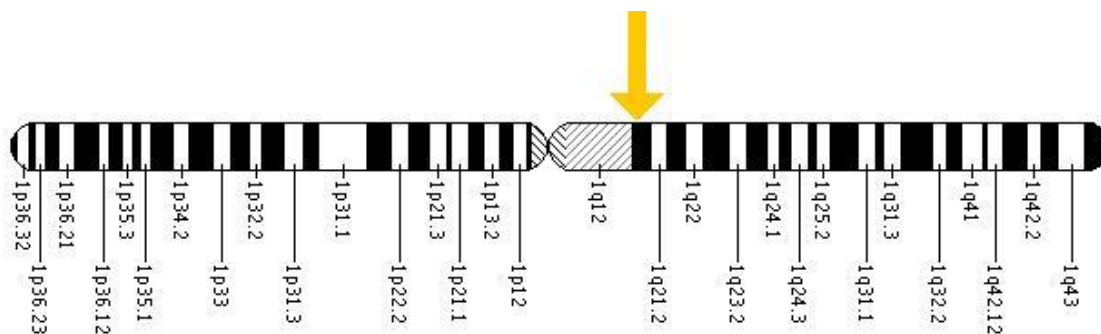


Figura 4. O gene *GBA* localizado no braço curto do cromossomo 1, locus 21. Figura retirada de <http://ghr.nlm.nih.gov/dynamicImages/chromomap/gba.jpeg>

Mais de 300 mutações já foram descritas no gene *GBA* segundo, (Hruska *et al* 2008). Entre os judeus Ashkenazi, quatro mutações são responsáveis por 90% dos casos, N370S, L444P, 84insG, e IVS2+1G>A. Na população não-judaica, a doença apresenta baixa prevalência, e as mutações mais comumente identificadas são as L444P, N370S, D409H, R463C, e IVS2+1G>A como evidencia a figura 5. (Horowitz & Zimran, 1994; Michelin *et al.* 2005).

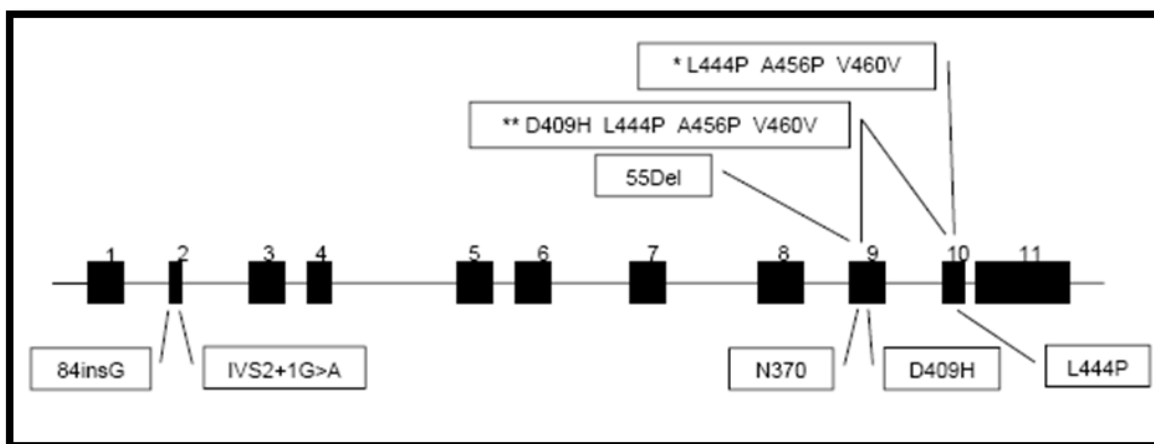


Figura 5. Estrutura do gene *GBA* e principais mutações causadoras da DG. Figura retirada da tese de doutorado de Roberto Rozenberg “Análise molecular das doenças de Gaucher e Tay-Sachs no Brasil” São Paulo, 2006

A relação genótipo/fenótipo ainda não está bem descrita, uma vez que, há casos de irmãos com o mesmo genótipo que apresentam diferenças no quadro clínico e na resposta terapêutica. Até mesmo entre gêmeos monozigóticos foi

constatado grau variável da Doença de Gaucher; dificultando dessa forma o uso do genótipo do paciente para determinar o prognóstico preciso, a terapêutica apropriada e um melhor aconselhamento genético, (Sidransky, 2004).

As únicas correlações genótipo-fenótipo dizem respeito às mutações N370S e L444P, as quais distinguem a forma não-neuropática da forma-neuropática. O fenótipo neuropático está relacionado à mutação L444P em estado homozigoto, sendo encontrado mais freqüentemente nos tipos III e II da doença. O fenótipo não neuropático está associado ao alelo N370S, (Barranger & O'Rourke, 2001).

O fenótipo clínico dos pacientes é resultado principalmente da combinação da gravidade das mutações nos dois alelos do pacientes. Essas podem ser classificadas de três maneiras, alelos nulos (nenhuma enzima é produzida), mutações graves (a atividade residual da enzima é muito baixa e de forma instável), e mutações leves (a enzima tem uma baixa atividade, mas estável) (Cormand *et al*, 1998b).

(Dvir *et al*, 2003) e (Liou *et al*, 2006), tentaram correlacionar a gravidade da doença, o tipo de mutação e a estrutura da proteína através da análise por difração de raios-X , ambos revelaram uma estrutura protéica idêntica com três domínios. O I domínio é formado pelos aminoácidos 1 a 27 e 383 a 414. O II domínio é formado pelos resíduos de aminoácidos 30-75 e 431-497 com estrutura similar a uma imunoglobulina. Os dois primeiros domínios possivelmente têm função regulatória ou estrutural. O III domínio é formado pelos resíduos de aminoácidos 76-381 e apresenta o sítio ativo nos aminoácidos E340 e E235, figura 6.

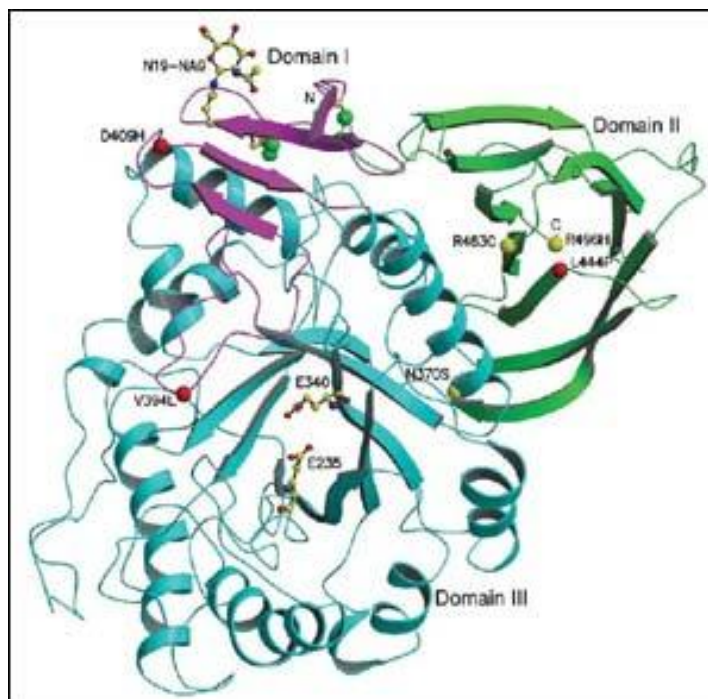


Figura 6. Representado em lilás o I domínio, em verde o II domínio e em azul o III domínio, o sítio catalítico da enzima está representado em amarelo no centro da enzima. Retirado de (Dvir *et al*, 2003)

As mutações podem impedir parcial ou totalmente a atividade catalítica da proteína ou interferir em sua estabilidade. Aparentemente as mutações estão distribuídas aleatoriamente na proteína, não tendo assim um domínio mais propício à ocorrência de mutações. As mutações de efeito leve e grave têm distribuição homogênea nos diferentes domínios, no entanto, a região próxima ao sítio ativo da enzima apresenta mutações de efeito grave, (Rozenberg *et al*, 2006).

A maioria das mutações já descritas em diversas populações parece indicar a existência de uma região do gene *GBA* que concentra o maior número de mutações. Essa região se localiza entre os éxons oito e onze, onde também estão presentes as mutações L444P e N370S, (Beutler *et al*, 2005).

O gene *GBA* possui um pseudogene (*psGBA*), localizado no cromossomo um, com distancia aproximada de 16kb do gene. Trata-se de uma cópia não funcional do gene, com sequencia 96% idêntica ao *GBA* (Horowitz *et al*. 1989). A presença do pseudogene pode levar a formação de alelos recombinantes, devido a erros de recombinações onde o gene *GBA* parecia-se erroneamente ao

pseudogene do cromossomo homólogo originando assim um cromossomo com sequências do gene e do pseudogene possibilitando várias alterações no mesmo alelo, (Cormand *et al.*, 1998a).

A presença do psGBA dificulta o trabalho de detecção de mutações no GBA. Devido a grande homologia entre eles é necessário a criação de estratégias específicas de análise para que se investigue somente o gene e exclua o pseudogene, quando se amplifica o GBA por PCR. (Sorge *et al.*, 1990). Entre as principais recombinações já identificadas estão as que ocasionam as mutações: L444P, A456P, V460V e D409H, (Latham *et al.*, 1990).

1.2.7. Justificativa

A doença de Gaucher pertence à classe de erros inatos do metabolismo, sendo de grande importância como objeto de estudo, por ser a doença mais freqüente dentre as doenças lisossômicas de depósito. A grande variedade de mutações relacionadas à doença de gaucher sugere que esta seja uma doença heterogênea do ponto de vista molecular. As variações fenotípicas observadas podem estar relacionadas a essa heterogeneidade molecular.

A investigação molecular do gene GBA é de fundamental importância, tendo em vista que os achados moleculares encontrados em pacientes com essa enfermidade poderiam ser correlacionados com os dados clínicos e bioquímicos dos pacientes estudados, possibilitando assim uma melhor compreensão da fisiopatologia da doença, além de que estudos como este ainda vem sendo pouco desenvolvidos no estado do Pará, havendo assim a necessidade de uma melhor análise da doença em nossa região.

A determinação do genótipo do paciente também pode fornecer informações à família, sobre o prognóstico do paciente e a possibilidade de prevenção de novos casos. Uma melhor compreensão das regiões mais importantes para o funcionamento normal da enzima pode ser estabelecida a partir da determinação da freqüência das mutações no gene GBA na nossa população.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Análise Molecular do Gene GBA em pacientes com Doença de Gaucher.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar as mutações comuns nos exons 8, 9, 10 e 11 do gene GBA em pacientes com DG do Estado do Pará, estabelecimento a incidência das mesmas na amostra em estudo;
- Identificar e caracterizar as mutações raras e/ou novas encontradas nos éxons 8, 9, 10 e 11do gene GBA em pacientes com DG do Estado do Pará;

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA:

A amostra estudada neste projeto foi composta por sete famílias, contendo sete pacientes com DG, os quais recebem terapia de reposição enzimática no Hemocentro do Pará – HEMOPA e dez pais de pacientes somados em um total de dezessete indivíduos.

3.2 ASPECTOS ÉTICOS:

Este trabalho levou em consideração os princípios éticos básicos das diretrizes e normas que regulamentam a pesquisa em seres humanos: autonomia, beneficência, não maleficência e justiça. Foi realizado um contato pessoal com algumas famílias de pacientes, no qual foram explicados os objetivos do estudo, com esclarecimento de todas as dúvidas levantadas pela família, no qual os pacientes assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido. Anexo I

Presente trabalho foi aprovado pelo comitê de ética da fundação HEMOPA. Anexo II (aprovação do comitê de ética).

O material biológico coletado foi utilizado apenas neste estudo e ficou armazenado sob a responsabilidade do pesquisador responsável (coordenador do estudo).

3.3 COLETA E ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS

Amostra de sangue total (5 a 10 mL) foi obtida por punção venosa e colhida em frascos de vidro de 5 mL contendo 54 μ L do anticoagulante EDTA. Em seguida

a mesma foi adequadamente identificada (nome do paciente e data da coleta) e armazenada a -22°C até o momento da extração de DNA.

3.4 EXTRAÇÃO DE DNA

As amostras de DNA foram obtidas a partir de leucócitos, por método convencional de extração segundo o Método do Fenol-Clorofórmio, (Old e Higgs, 1993).

3.5 AMPLIFICAÇÃO DO GENE GBA POR REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

A PCR propicia a amplificação de segmentos específicos de DNA a partir de uma seqüência molde. Para esta técnica são utilizados iniciadores específicos que flanqueiam a região de interesse do DNA, possibilitando sua multiplicação em milhares de cópias de um determinado segmento de DNA.

O gene foi, primeiramente, amplificado em um grande fragmento que abrange dos éxons 8 ao 11 do gene GBA (Sidransky *et al.*, 2000; Rozemberg *et al.*, 2006). Tal procedimento torna-se necessário, visto que possibilita a análise do gene funcional, evitando a amplificação de um pseudogene que é 95% homólogo ao gene funcional.

Posteriormente à pré-amplificação, foi realizada a amplificação interna dos éxons 8, 9, 10 e 11 através de iniciadores desenvolvidos através do programa Primer3 Input 0.4.0.

3.6 ANÁLISE DE DIGESTÃO COM ENDONUCLEASES DE RESTRIÇÃO (RFLP)

A detecção das mutações N370S e L444P foi feita através da técnica de PCR-RFLP (Reação em Cadeia da Polimerase - Polimorfismo de Fragmentos de

DNA obtidos por Enzimas de Restrição). A técnica de PCR-RFLP é utilizada na identificação de polimorfismos ou mutações que determinam a alteração do padrão de clivagem, devido a substituições pontuais em sítios de restrições, obtidos a partir de uma determinada região do DNA. Os primers e as enzimas utilizadas na detecção das mutações N370S e L444P encontram-se descritas na tabela um respectivamente. A pesquisa das mutações N370S e L444P foram realizadas em gel de agarose 3% e poliacrilamida 15%, respectivamente.

Tabela 1: Estratégia de detecção das mutações N370S e L444P.

Mutação	Substituição	Primers	Enzima restrição	Tamanhos dos Fragmentos	
				Normal	Mutante
N370S	1226A>G	F: 5'-GCCTTTGTCCTTACCCTCG-3' R: 5'-GACAAAGTTACGCACCCAA-3'	XhoI	105	89 e 16
L444P	1448T>C	F: 5'-TGAGGGTTTCATGGGAGGTA-3' R: 5'-AGAGTGTGATCCTGCCAAGG-3'	NciI	243	128 e 115

3.7 SEQUENCIAMENTO DO DNA E IDENTIFICAÇÃO DE MUTAÇÕES

Além da análise por endonucleases de restrição, foi utilizado também o método de sequenciamento direto dos éxons 8, 9, 10 e 11, a fim de identificar outras mutações menos frequentes e confirmar as mutações identificadas por RFLP. Esta região é onde há a maior concentração de mutações inclusive as mutações N370S e L444P.

A metodologia utilizada baseou-se na síntese bioquímica da cadeia de DNA utilizando o kit ABI PRISM™ Dye Terminator Cycle Sequencing (Applied Biosystems, USA) e o seqüenciador automático ABI-PRISM 377, da Applied Biosystem.

4. RESULTADOS

4.1 - ANÁLISE POR DIGESTÃO COM ENDONUCLEASES DE RESTRIÇÃO:

4.1.1 Detecção da mutação N370S:

Na presença da sequência normal, a região de 105 pb não é clivada pela enzima. Na presença da mutação, a enzima cliva a região de 105 pb em dois fragmentos menores de 89 pb e 16 pb como pode ser observado na figura 7.

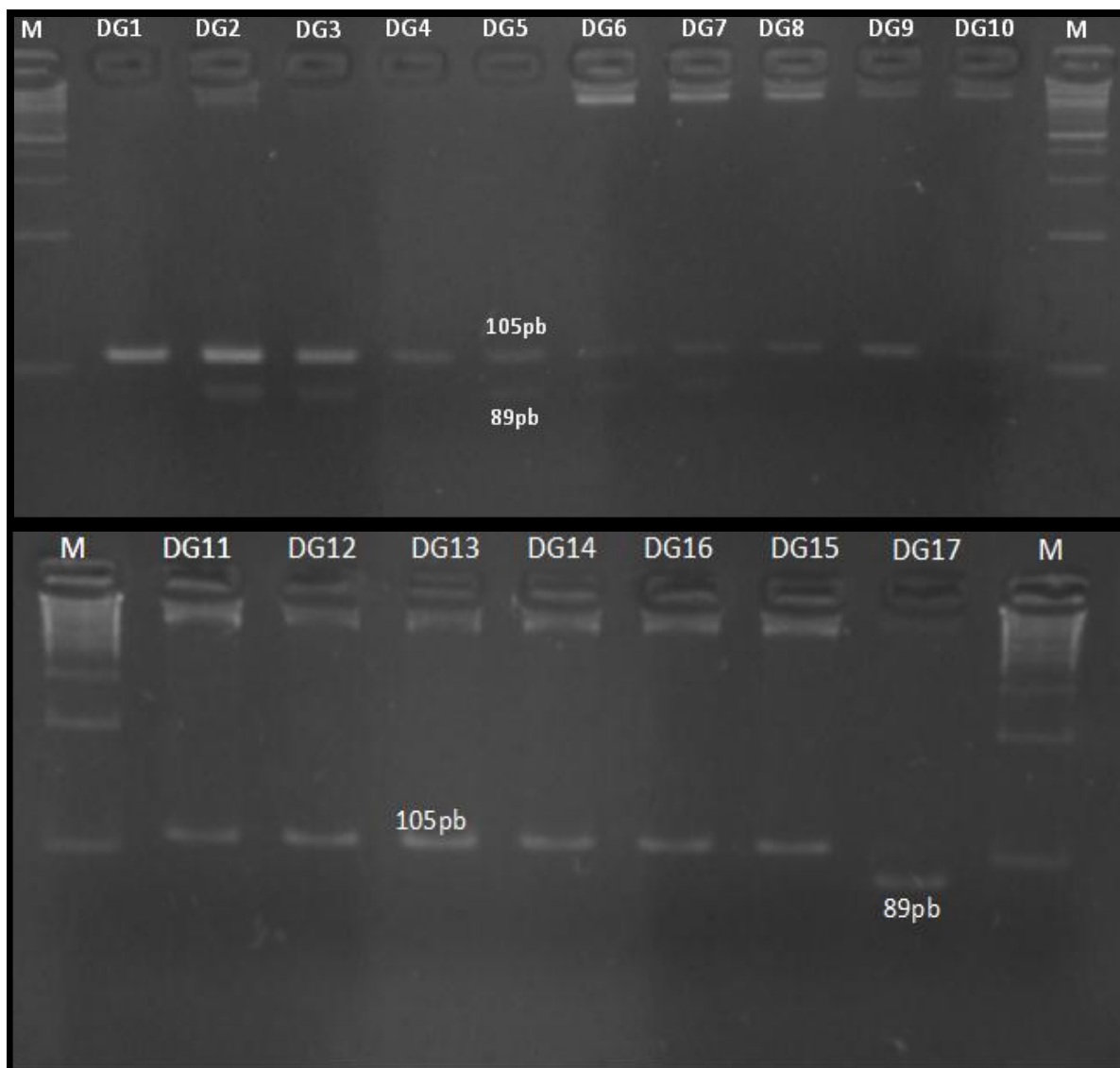


Figura 7: Detecção da mutação N370S – Eletroforese dos produtos de digestão em gel de agarose 3,0% (p/v). Canaletas M: marcador de peso molecular de 100 pb. Canaletas DG2, DG3, DG5, DG6 e DG10: heterozigoto para mutação N370S. Canaleta DG17: paciente homozigoto para mutação N370S. Canaletas restantes: pacientes DG sem mutação N370S.

4.1.2 Detecção da mutação L444P:

Na presença da sequência normal, a região de 243 pb não é clivada pela enzima. Na presença da mutação, a enzima cliva a região de 243 pb em dois fragmentos menores de 128 pb e 115 pb, como pode ser observado na figura 8.

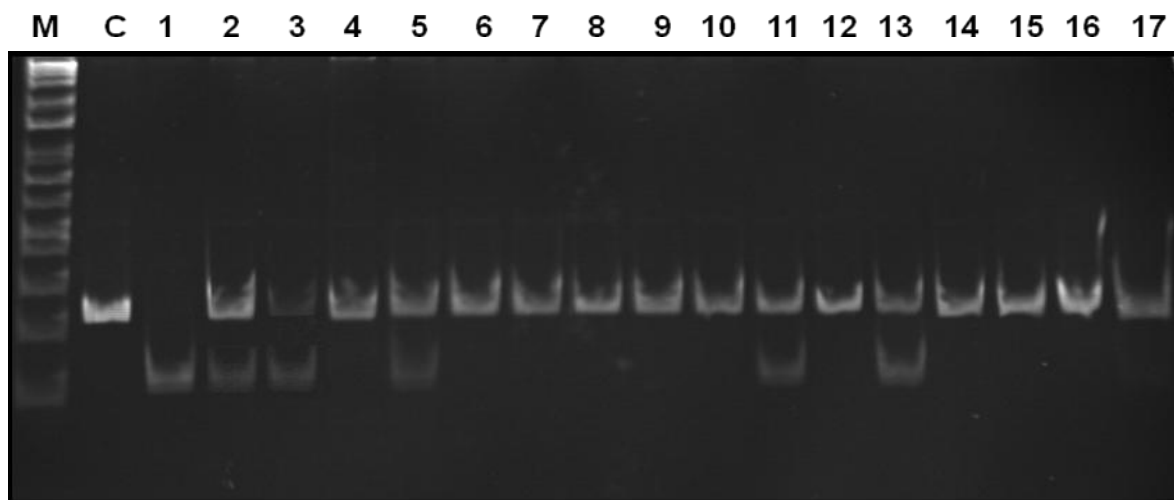


Figura 8: Detecção da mutação L444P – Eletroforese dos produtos de digestão em gel de poliacrilamida 15% (p/v). Caneleta M: Marcador molecular de 100pb. Caneleta C: homozigoto normal. Caneleta 1: homozigoto para mutação L444P. Caneletas 2, 3, 5, 11 e 13: heterozigotos para a mutação L444P.

4.2 SEQUENCIAMENTO DIRETO:

Para identificação de outras mutações menos freqüentes foi utilizado o método de seqüenciamento direto. Foram identificadas duas alterações diferentes: o polimorfismo T369M (c.1223C>T) presente no éxon 8 e a mutação H419Y (c.1372C>T) presente no éxon 9 (figuras 7 e 8).

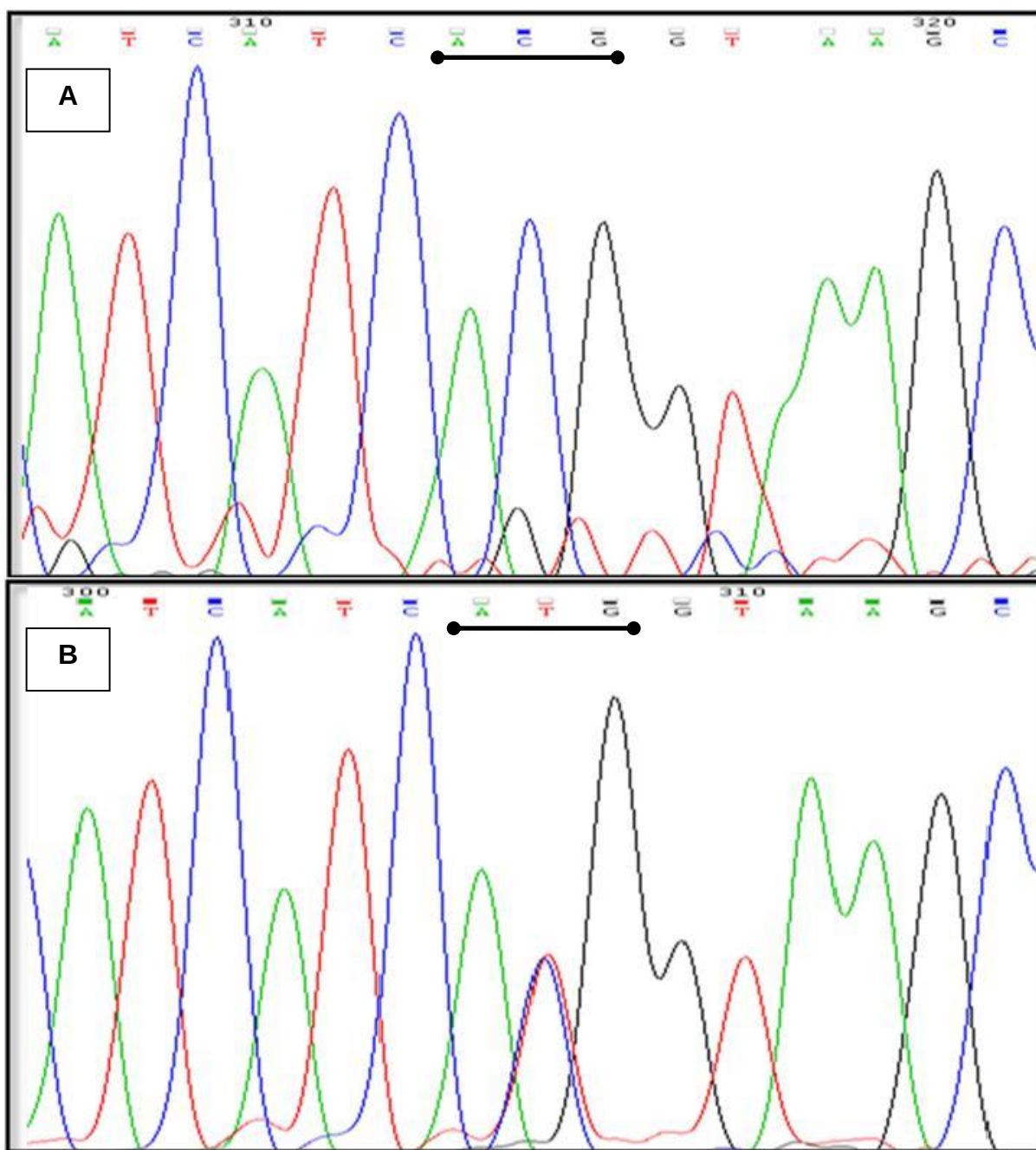


Figura 9. A: alelo selvagem. B: Alteração T369M (C >T)

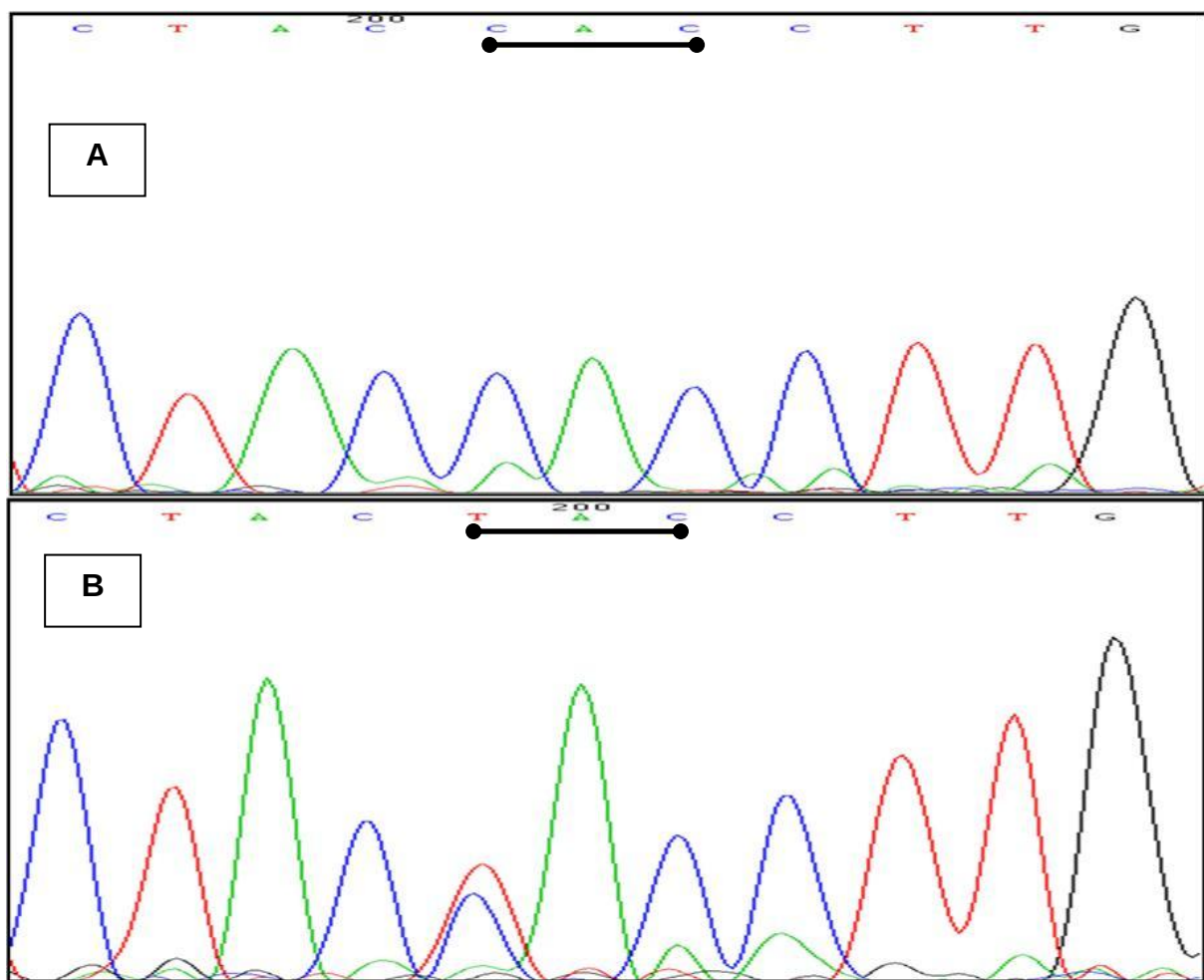


Figura 10. A: Alelo selvagem. B: Alteração H458Y (C >T)

4.3 FREQUENCIA ALÉLICA E GENOTÍPICA

As tabelas 2 e 3 demonstram a frequência dos alelos e dos genótipos encontrados, respectivamente.

Tabela 2. Frequência de alelos mutantes encontrados no gene GBA de pacientes com Doença de Gaucher.

Mutação	Frequência
N370S	42,85%
L444P	28,57%
H419Y	7,14%
T369M	7,14%
Total de alelos identificados	85,70%

Tabela 3. Genótipo encontrado nos 17 indivíduos analisados.

Genótipo	Número de Pacientes
?/?*	1 (14,28%)
N370S/?	1 (14,28%)
N370S/L444P	1 (14,28%)
N370S/T369M	1 (14,28%)
N370S/H419Y/L444P	1 (14,28%)
N370S/N370S	1 (14,28%)
L444P/L444P	1 (14,28%)
Total	7 (100%)

*? = Mutação não identificada

5. DISCUSSÃO

A implementação de técnicas de biologia molecular na DG na região Norte é um trabalho pioneiro, pois até o momento não havia nenhum relato do perfil genotípico dos pacientes portadores dessa afecção.

Este trabalho ressalta a importância de implantar tecnologias que podem auxiliar no diagnóstico de doenças genéticas na nossa região. Todo o procedimento de genotipagem dos indivíduos foi feito no LEIM e já pode ser aplicado na investigação molecular da doença de Gaucher.

A metodologia utilizada neste trabalho foi a mesma utilizada em trabalhos publicados no Rio Grande do Sul e em São Paulo que são centros de referência em pesquisa de Erros Inatos do Metabolismo no Brasil, utilizando como base para pesquisa de mutações, na maioria dos casos, as técnicas de PCR-RFLP e Sequenciamento direto.

A frequência alélica da mutação N370S e L444P entre os pacientes do Pará foi de 42,85% e 28,57%, respectivamente, o que está de acordo com a frequência encontrada por (Rozemberg *et al.*, 2006) que relatou que a frequência destas mutações para pacientes oriundos de varias regiões do Brasil se dá em aproximadamente 47% e 27% dos alelos de pacientes com DG, respectivamente. O que se apresenta de acordo com as frequências alélicas destas mutações descritas na literatura para pacientes não judeus Norte-Americanos (Zhao & Grabowski, 2002). Apesar do pequeno número de pessoas analisadas o trabalho se manteve de acordo com trabalhos que analisaram mais de 50 pacientes. Apesar do pequeno numero amostral, este estudo se mostra representativo por representar o total de pessoas diagnosticadas com DG no estado do Pará até o momento em que foi desenvolvido o trabalho.

A alteração identificada no trabalho como T369M foi primeiramente descrita por (Beutler & Gelbart, 1996), como sendo uma mutação patogênica causadora de DG, porém (Sidransky, 2003), publicou que a mutação T369M parece ser mais um polimorfismo presente na população, pois os pacientes com esta alteração geralmente apresentavam uma outra alteração no mesmo alelo e quando foi

pesquisada em 100 controles, dois alelos foram identificados com esta alteração, representando 1% do total estudado. O paciente identificado em nosso estudo com a alteração T369M é um heterozigoto composto e apresenta o genótipo T369M/N370S. Este paciente possui o diagnóstico clínico e bioquímico de DG e se apresenta em terapia de reposição enzimática no HEMOPA, levantando a possibilidade desta mutação T369M ser considerada patogênica. Porém é necessário que se analise todo o gene *GBA* desta paciente em busca de outras mutações em exons ainda não analisados e que seja realizado estudos de expressão para a mutação T369M.

A alteração H419Y ainda não foi descrita na literatura e consiste em uma substituição de C pelo nucleotídeo T na posição 1372 do cDNA o que resulta na troca de Histidina por Tirosina no resíduo de aminoácido 419. Esta alteração se apresentou em dois indivíduos das sete famílias analisados, os dois apresentam alto grau de parentesco (mãe e filha), sendo a mãe heterozigota e a filha paciente em tratamento com genótipo de heterozigose composta (N370S/H419Y/L444P). Na análise molecular da mãe da paciente, esta apresentou somente a alteração H419Y, coincidindo com o achado presente na paciente, porém não foi possível coletar o sangue do pai da paciente, o que impossibilita afirmar que as outras duas mutações identificadas tenham sido herdadas do pai ou se são frutos de um crossing-over desigual devido ao mal pareamento dos cromossomos homólogos, como já foi descrito por Cormand *et al.*, 1998a em que o gene *GBA* parecia-se erroneamente ao ps*GBA* originando algumas recombinações que podem resultar nas mutações L444P, A456P, V460V e D409H.

Ainda não é possível afirmar que a alteração H419Y é de fato uma mutação. Para verificar a frequência desta alteração serão analisados 200 alelos controles para confirmar se é uma alteração comum na população ou não. Ainda assim, serão necessários estudos de expressão para determinar se esta é uma alteração patogênica. De posse destes dados pode se inferir se há alguma correlação do genótipo com o fenótipo bioquímico e clínico do paciente.

Em relação ao paciente que não apresentou alteração nos éxons citados, é necessário analisar o restante dos éxons do gene *GBA* a procura de mutações menos freqüentes. Este trabalho só focou os éxons citados por serem os mais representativos no número de mutações sendo os mais indicados para início de pesquisa de mutações no *GBA*, segundo (Rozemberg *et al*, 2006).

6. Conclusões

O presente estudo realizou a análise molecular do gene *GBA* em sete pacientes com DG e dez pais de pacientes, representando um total de oito famílias.

A análise dos dezessete indivíduos demonstrou uma frequência alélica de: N370S – 42,85% presente em cinco famílias, L444P - 28,57% presente em três famílias, H419Y - 7,14% presente em uma família e T369M presente em uma família.

Nenhum dos pacientes apresentou o mesmo genótipo, evidenciando mais uma vez a heterogeneidade da doença.

Este estudo identificou pela primeira vez a alteração H419Y, presente em uma das famílias analisadas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAÚJO, A.P.Q.C. **Doenças** metabólicas com manifestações psiquiátricas. **Rev. Psiq. Clín.** **31** 6; 285-289, 2004.

BARRANGER JA, TOMICH J, WEILER S, SAKALLAH S, SANSIERI C, MIFFLIN T, ET AL. Molecular biology of glucocerebrosidase and the treatment of Gaucher disease. **Cytokines Mol Ther** **1**:149-63, 1995.

BARRANGER JA, O'ROURKE E. Lessons learned from the development of enzyme therapy for Gaucher disease. **J Inherit Metab Dis** **24**: 89-96, 2001.

BEUTLER E, GELBART T, BALICKI D, DEMINA A, ADUSUMALLI J, ELSAS L, GRINZAID KA, GITZELMANN R, SUPERTI-FURGA A, KATTAMIS C, LIOU BB. Gaucher disease: four families with previously undescribed mutations. **Proc Assoc Am Physicians** **108**:179–184.

BEUTLER E, GELBART T, KUHLE W, ZIRAM A, WEST C. Mutation in Jewish patients with Gaucher disease. **Blood Cells** **79**:1662-1666, 1992.

BEUTLER E, GELBART T, SCOTT CR. Hematologically important mutations; Gaucher disease. **Blood Cells** **35**:355-364, 2005.

BEUTLER E, GRABOWSKI T. Hematologically important mutations; Gaucher disease. **Blood Cells** **24**: 2-8, 1998.

BEUTLER E, & GRABOWSKI G. Gaucher Disease In: **The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease**. Scriver CR, Beaudet AL. (eds) Sly WS, 4^o ed. McGraw Hill, New York. 2001. p.3635-3658

CARAKUSHANSKY, G. **Doenças Genéticas em Pediatria** Ed. Guanabara. 2001.

DVIR H, HAREL M, MCCARTHY AA, TOKER L, SIMAN I, FUTERMAN AH, SUSSMAN JL. X-ray structure of human acid-beta-glucosidase, the defective enzyme in Gaucher disease. **EMBO rep** 4: 704-709, 2003.

GIUGLIANI, R. Erros Inatos do Metabolismo: Uma Visão Panorâmica. In: **Pediatria Moderna**, 23 (1): 29 – 39. 1988.

GLEW, R.H.; BASU, A.; PRENCE, E.M.; REMALEY, A.T. Lysosomal Storage Disease: Biology Disease. **Lab. Invest.** 53 3: 250-269. 1985

GRABOWSKI GA, LESLIE N AND WENSTRUP R. Enzyme therapy for Gaucher disease: the first 5 years. **Blood Rev** 12(2):115-133. 1998

HERMANN, T. Primary hyperparathyroidism: Postoperative normocalcemic hyperparathyrinemia after curative parathyroidectomy. **Chirurg**. May 27, 2009

HOROWITZ M, WILDER S, HOROWITZ Z, REINER O, GELBART T, BEUTLER E. The human glucocerebrosidase gene and pseudogene: structure evolution. **Genomics** 4:87-96. 1989.

CORMAND B, HARBOE TL, GORT L, CAMPOY C, BLANCO M, CHAMOLES N, CHABAS A, VILAGELIU L, GRINBERG D. Mutation analysis of Gaucher disease patients from argentina: high prevalence of the RecNcil mutation. **AM J Med Genet** 80:343-351. 1998

CORMAND B, GRINBERG D, GORT L, CHABAS A, VILAGELIU L. Molecular analyses and clinical findings in the Spanish Gaucher disease population: putative haplotype of N370S ancestral chromosome. **Human Mutation** 11:295-305. 1998.

HOROWITZ M, ZIMRAN A. Mutations causing Gaucher disease. **Human Mutation** 3:1-11. 1994.

LIU B, KAZIMIERCZUK A, ZHANG M, SCOTT CR, HEDGE RS, GRABOWSKI GA. Analisis of Variant Acid beta-Glucosidase: Efect of Gaucher Disease Mutations. **J Biol Chem** **281**:4242-4253. 2006.

MARTINEZ-ARIAS R, CALAFELL F, MATEU E, COMAS D, ANDRÉ A, BERTRANPETIT J. Sequence variability of human pseudo-gene. **Genome Res** **11**:1071-1085. 2001.

MARTINEZ-ARIAS R, COMAS D, MATEU E, BERTRANPETIT J. GlucocerebrosidasePseudo-gene Variation and Gaucher Disease: Recognizing Pseudo-gene Tracts In GBA alleles; *Genome Res*. **Genome Res** 2001.

MEIKLE PJ, HOPWOOD JJ, CLAGUE AE, CAREY WF. Prevalence of lysosomal storage disorders. **JAMA** **281**:249-54. 1999.

METHA A. Epidemiology and natural history of Gaucher's disease. **Eur J Intern Med** **17**:S13-S15. 2006

METHA A. Clinical Experience with substrate reduction therapy. **Eur J Intern Med** **17**:S13-S15; 2006

MICHELIN, K ; WAJNER A; BOCK, H; FACHEL, A.; ROSENBERG, R.;PIRES, RF, MARIA LUIZA SARAIVA PEREIRA, ML.; GIUGLIANI R.;COELHO, JC. Biochemical properties of h-glucosidase in leukocytes from patients and obligated heterozygotes for Gaucher disease carriers. **Clinica Chimica Acta** **362**:101–109. 2005.

OLIVEIRA, M.C.L.A.; OLIVEIRA, B.M.; QUEIRÓS, E.; VIANA, M.B. Aspectos Clínicos e Nutricionais da Doença de Gaucher: Estudo prospectivo de 13 crianças em um único centro, **Revista do Hospital de Clínicas de Porto Alegre**, 2004.

PATRICK A.D. Deficiency of Glucocerebrosidase in Gaucher's disease. **Biochem J** **97**: 17c; 1965

ROZENBERG, R, F.T. ARAÚJO, D.C. FOX, P. ARANDA, A. NONINO, C. MICHELETTI, A.M. MARTINS, R. CRAVO, E. SOBREIRA, L.V. PEREIRA. High frequency of mutation G377S in Brazilian type 3 Gaucher disease patients, **Brazilian Jornal of Medical and Biological Research** **39**:1171-1179. 2006.

SCRIVER, C.R.; BEAUDET, A.L.; SLY, W.S.; VALLE, D. **The metabolic and molecular bases of inherited disease**. 8^a ed, New York: McGraw-Hill, Inc. 2001.

SIDRANSKY E. Glucocerebrosidase mutation T369M appears to be another polymorphism. **Clin Genet** **63**:237-238. 2003.

SIDRANSKY E. Gaucher disease: complexity in a “simple” disorder. **Mol Genet Dis** **83**:6-15 2004.

SIDRANSKY E, LAMARCA M. E, GINNS E. I. Therapy of gaucher disease: don't stop thinking about tomorrow. **Mol Genet Metabol**, doi: **10**:1016 2006.

VOET, D., VOET, J.D., PRATT, C.W, **Fundamentos de bioquímica**. Porto Alegre. 2004.

WAJNER, M.; VARGAS, R.C.; BURIN, G.M.; GIUGLIANI, R. & COELHO, J.C. Investigação de Erros Inatos do Metabolismo. **Revista do Hospital de Clínicas de Porto Alegre** **21** **3**: 343 – 360. 2001

WILCOX WR. Lysosomal storage disorders: the need for better pediatric recognition and comprehensive care. **Jornal Pediatrics** **5**;144(5 Suppl):S3-14. Review. 2004.

8. ANEXOS:

8. 1. ANEXO I

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Você está sendo convidado(a) a participar, como voluntário(a), da pesquisa – sobre “INVESTIGAÇÃO DE VARIANTES ALÉLICAS NO GENE GBA EM PACIENTES COM DOENÇA DE PARKINSON: RELAÇÃO COM A DOENÇA DE GAUCHER?” que é desenvolvida pela Universidade Federal do Pará, Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo. Para que você decida participar ou não da pesquisa lhe serão prestadas as seguintes informações:

- O título do projeto é “Investigação de variantes alélicas no gene GBA em pacientes com Doença de Parkinson: relação com a doença de Gaucher?”
- O pesquisador responsável é o Prof. Dr. Luiz Carlos Santana da Silva, Biomédico, Professor da Universidade Federal do Pará.
- O objetivo da pesquisa é investigar a presença de marcadores genéticos e bioquímicos em pacientes com doença de Parkinson.
- Esta é uma pesquisa sigilosa e garantido o total anonimato dos participantes do estudo, isto significa que, somente os pesquisadores terão acesso aos resultados.
- Serão necessários 2mL de sangue para análises em DNA e 8mL de sangue para as análises bioquímicas. Os riscos associados a esse procedimento são mínimos por que os métodos e práticas são de uso rotineiro, podendo ocorrer dor e manchas roxas (equimoses) no local da coleta.
- Serão utilizados materiais esterilizados descartáveis como agulhas e seringas.
- Ninguém é obrigado a participar da pesquisa, assim como poderá deixar a pesquisa no momento que quiser, pois não haverá prejuízo pessoal por esta causa.
- Não haverá nenhum tipo de despesa para participação da pesquisa, assim como não haverá nenhuma forma de pagamento para participação.

Informações: Centro de Ciências Biológicas - Departamento de Fisiologia -

Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo - Fone: 3201-8030 - E-mail:

lcss@ufpa.br ou bionatalie@uol.com.br.

Assinatura do Pesquisador Responsável

CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Declaro que li as informações acima sobre a pesquisa, que me sinto esclarecido (a) sobre o conteúdo da mesma. Declaro ainda que, por minha livre vontade, aceito participar da pesquisa cooperando com a coleta de material para exame.

Belém, ____ / ____ / _____

Assinatura do participante	Assinatura do Responsável
----------------------------	---------------------------

Testemunhas (não ligadas à equipe de pesquisadores):

Nome: _____ Assinatura: _____

Nome: _____ Assinatura: _____

8.2 ANEXO II

ANEXO II: DOCUMENTOS DE APROVAÇÃO DO PROJETO POR CEP LOCAL



Belém, 02 de junho de 2006

Ao Pro. Dr. LUIZ CARLOS SANTANA DA SILVA

Prezado Senhor:

Cumprimentando-o cordialmente, cumpre-nos enviar Parecer Consubstanciado de Projeto de Pesquisa *Avaliação Clínica e Bioquímica de Pacientes com Doença de Gaucher submetidos à Terapia de Reposição Enzimática*, aprovado por este CEP.

Respeitosamente

LUCIANA MARADEI

Coordenadora do CEP

Centro de Hemoterapia e Hematologia do Pará – HEMOPA

Dr.ª Luciana Maradei
Coordenadora do CEP

Tv Padre Eutíquio 2109

Bairro Batista Campos

CEP 66033-000

Belém-Pará



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
Parecer Consubstanciado

Belém, 01 de junho de 2006

Parecer nº 04/06

Análise do Projeto:

O projeto "*Avaliação Clínica e Bioquímica de Pacientes com Doença de Gaucher submetidos à Terapia de Reposição Enzimática*", do pesquisador Prof. Dr. Luiz Carlos Santana da Silva, da Universidade Federal do Pará, foi recebido neste CEP em 08/05/2006, levado à análise prévia de dois membros do comitê e levado à apreciação em reunião de 31/05/2006, ocasião em que foi recomendado sem pendências. Tem como finalidade servir de Dissertação de Mestrado à Dra. Ana Maria Almeida Souza, participante do projeto como "orientanda". O Projeto consta também com a colaboração da Dra. Maria de Fátima Pombo Montoril, na qualidade de co-orientadora.

Tem como objetivo geral o estudo das manifestações clínicas e bioquímicas de pacientes com diagnóstico de Doença de Gaucher em tratamento de reposição enzimática, tendo portanto, como critério de inclusão, esses pacientes. O estudo se estende para os pais e irmãos dos pacientes em questão.

A população alvo são pacientes diagnosticados, tratados e acompanhados clínica e laboratorialmente no ambulatório da Fundação HEMOPA.

Em relação ao Risco/Benefício, a pesquisa não apresenta riscos para os participantes envolvidos e trará benefícios da possibilidade de avaliar a melhoria clínica e laboratorial dos pacientes e conseqüente melhoria da qualidade de vida dos mesmos, além de levar ao conhecimento científico a existência dessa patologia no Estado do Pará, estimulando um diagnóstico precoce.

O orçamento é detalhado e adequado à proposta e a bibliografia é pertinente ao tema proposto.

O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) contém dados em linguagem acessível ao participante, além de dados do pesquisador, incluindo endereço e telefone para qualquer contato necessário.

Dr. Luciana Maradei
Coordenadora do CEP

Trav. Padre Eutíquio, 2109 - Fone: 242-9100 - CEP 66033-000 - Belém - Pará



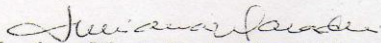
**Parecer do CEP:**

Trata-se de um de estudo clínico e bioquímico, Grupo III, apresentando termo de concordância escrito dos serviços participantes. O projeto está bem estruturado, com justificativas e objetivos claros e consistentes, riscos e benefícios bem estabelecidos, Termo de Consentimento Livre e Esclarecido adequado e informação precisa quanto ao cronograma de pesquisa. Trará benefícios para a saúde pública, uma vez que a geração de conhecimentos a respeito dessa patologia poderá despertar a comunidade científica para a necessidade de um diagnóstico precoce, haja vista tratar-se de um erro inato do metabolismo quicá bem mais freqüente no nosso Estado.

O projeto foi recomendado à aprovação sem pendências em reunião do Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Centro de Hemoterapia e Hematologia do Pará, em 31 de maio de 2006, sem parecer contrário dos membros em reunião.

Está de acordo com a Res. CNS 196/96.

Parecer final: **FAVORÁVEL.**


Luciana Maria Cunha Maradei Pereira

Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa

Dr^a. Luciana Maradei
Coordenadora do CEP

Centro de Hemoterapia e Hematologia do Pará. – Fundação HEMOPA

Travessa Padre Eutíquio 2109, CEP 66033-000

Belém-Pará