



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE MEDICINA  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO DE INVESTIGACIÓN  
SECRETARÍA DE SALUD**

**INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA**

**DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE LAS MUTACIONES Q188R,  
K285N, N314D Y S135L EN PACIENTES CON GALACTOSEMIA  
CLÁSICA EN EL INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA.**

**T E S I S  
PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
ESPECIALIDAD EN GENÉTICA MÉDICA  
P R E S E N T A :  
SUSANA MONROY SANTOYO**

**TUTOR DE TESIS:  
DRA. ARIADNA GONZÁLEZ DEL ÁNGEL**

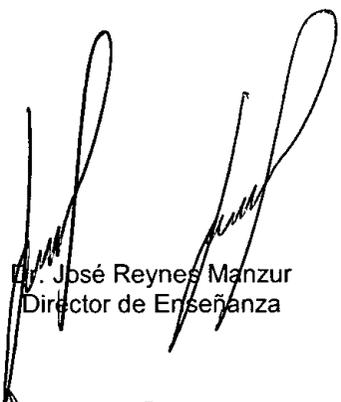


MÉXICO, D.F.

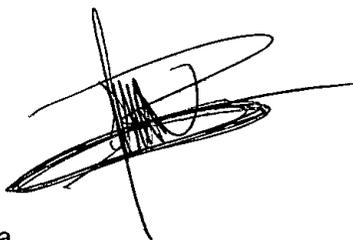
2007

**El éxito no se mide de acuerdo al lugar que se  
ha alcanzado, sino a los obstáculos que han  
tenido que vencerse.**

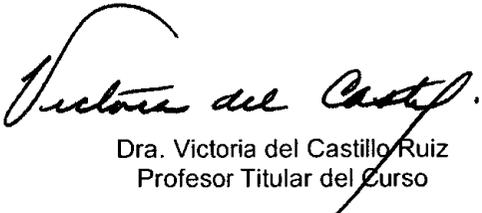
**DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE LAS MUTACIONES Q188R,  
K285N, N314D Y S135L EN PACIENTES CON GALACTOSEMIA  
CLÁSICA EN EL INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA.**



**Dra. José Reyes Manzur**  
Director de Enseñanza



**Dra. Mirella Vázquez Rivera**  
Jefa del Departamento de Pre y Posgrado



**Dra. Victoria del Castillo Ruiz**  
Profesor Titular del Curso



**Dra. Ariadna González del Ángel**  
Tutor del Trabajo de Investigación

## ÍNDICE.

	Pags.
Resumen	3
Introducción	6
Justificación	29
Objetivos	30
Diseño del estudio	30
Material y Métodos	31
Descripción General del Estudio	32
Análisis Estadístico	36
Consideraciones éticas	36
Resultados	37
Discusión	46
Conclusiones	49
Anexos	51
Referencias	55

# **DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE LAS MUTACIONES Q188R, K285N, N314D Y S135L EN PACIENTES CON GALACTOSEMIA CLÁSICA EN EL INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA.**

## **RESUMEN.**

**ANTECEDENTES:** La galactosemia clásica es un error del metabolismo autosómico recesivo causado por deficiencia de galactosa-1-fosfato-uridiltransferasa (GALT). Su frecuencia es de 1/40,000 recién nacidos vivos. Los síntomas inician a los pocos días de vida al presentar rechazo al alimento, letargia, hipotonía, hepatomegalia con o sin falla hepática e ictericia. A pesar de su curso potencialmente letal, dicho síndrome hepatotóxico neonatal puede ser prevenido con su diagnóstico temprano y restricción dietética de la galactosa, sin embargo, las complicaciones de esta patología a largo plazo aún son desconocidas. Actualmente se han descrito más de 165 mutaciones de *GALT*; las 3 mutaciones más frecuentes en población caucásica son la Q188R, K285N y N314D (observadas en el 80% de los pacientes), siendo las dos primeras bioquímicamente severas por condicionar ausencia de la actividad enzimática, mientras que la última, es moderada por exhibir actividad del 50%. La mutación S135L es prácticamente exclusiva de raza negra y también produce ausencia enzimática absoluta. No existen reportes en la literatura que describan la frecuencia de estas mutaciones en población mexicana.

**OBJETIVO:** Conocer la frecuencia de las mutaciones Q188R, K285N, N314D y S135L en pacientes con diagnóstico confirmado de galactosemia clásica y sus familiares en primer grado canalizados a través de la Unidad de Genética de la Nutrición del Instituto Nacional de Pediatría.

**MATERIAL Y MÉTODOS:** Se incluyeron 18 pacientes con diagnóstico confirmado de galactosemia clásica y sus familiares en primer grado. A todas las familias captadas se les realizó historia clínica completa con árbol genealógico y obtención de DNA genómico de leucocitos y/o células de descamación de mucosa oral, previa firma de consentimiento informado. La caracterización de las mutaciones Q188R, K285N y N314D se realizó por medio de amplificación por PCR y

digestión con endonucleasas de restricción específicas. Para la mutación S135L se realizó la técnica de amplificación por PCR alelo-específica. Se brindó asesoramiento a las familias captadas de acuerdo a los genotipos encontrados.

**RESULTADOS:** De los 18 pacientes estudiados, el 56% pertenecen al sexo femenino y el 44% al sexo masculino. El 78% de las familias presentaron casos únicos, mientras que en el 22% restante se observaron 2 pacientes afectados por familia. La edad promedio al momento del estudio fue de 2 años y el número total de familiares en primer grado estudiados fue de 31. Cinco de los 18 probandos resultaron homocigotos para la mutación Q188R; ellos presentaron ausencia total de la actividad de GALT y clínicamente grados variables de hepatomegalia, ictericia, tubulopatía, rechazo al alimento e hipotonía de inicio temprano, los cuales remitieron con la restricción dietética de lactosa; sólo uno de estos pacientes presentó catarata congénita. En 3 casos, dos de ellos referidos por tamiz neonatal anormal y uno por manifestaciones hepáticas y galactosa total >50 mg/dL, se identificó la mutación Q188R en un alelo y en el otro no se pudo caracterizar la mutación. Dos pacientes fueron heterocigotos compuestos (Q188R/N314D), ninguno presentó datos clínicos y el motivo de su envío al INP fue el hallazgo por tamiz neonatal de actividad enzimática disminuida y galactosa total en sangre >14 mg/dL. Se observaron 2 pacientes homocigotos para la mutación N314D y dos en el que sólo se caracterizó la mutación N314D en un alelo; en cada uno de estos grupos se presentó un paciente con catarata congénita incipiente y en el paciente genotipificado como homocigoto se sospecha disomía uniparental del cromosoma 9 o de una deleción en el alelo materno no identificado por la metodología utilizada. Un paciente con ausencia total de actividad enzimática, galactosa total >50 mg/dL, hepatopatía y retraso psicomotor se identificaron ambos alelos con la mutación S135L. Ninguno de los pacientes presentó la mutación K285N y en 3 casos no fue posible identificar las mutaciones responsables. Las frecuencias de los alelos fueron: Q188R (42%), N314D (22%), K285N (0%), S135L (6%) y alelos no identificados (30%).

**CONCLUSIÓN:** La prevalencia de los alelos Q188R y N314D fue discretamente más baja y similar, respectivamente, a la reportada en otras poblaciones a nivel

mundial. La ausencia de alelos K285N pudiera explicarse por el efecto fundador de la mutación en Europa oriental y a que probablemente la migración de pobladores originarios de dicha región está limitada en nuestro país. La identificación de la mutación S135L en una familia con 2 hermanos afectados confirma que en población mexicana existe una contribución genética de origen de raza negra; los dos pacientes portadores de dichos cambios no presentaban fenotipo negroide, ambos padres son originarios de población endogámica del Estado de México y niegan antecedentes de familiares de dicha raza. El conocer la frecuencia y tipo de mutaciones que condicionan la galactosemia clásica en la población mexicana, permitirá realizar la genotipificación en el tamiz neonatal ampliado, para establecer un tratamiento temprano en los pacientes y así evitar secuelas. En las familias se podrá brindar asesoramiento genético de certeza con relación a la identificación de portadores, e incluso ofrecerles la posibilidad de diagnóstico prenatal. En un futuro, además, nos permitirá el realizar la búsqueda de mutaciones responsables de galactosemia clásica en otro grupo de padecimientos, como aquellos con defectos de canalización genital, infertilidad femenina o catarata presenil aislada, en los cuales se ha demostrado en la literatura que un porcentaje de ellos son causados por mutaciones de *GALT* en estado heterocigoto.

## **INTRODUCCIÓN.**

### **ANTECEDENTES HISTÓRICOS**

La primera descripción detallada de la galactosemia fue realizada por Goppert en 1917. El paciente presentaba hepatomegalia, ictericia, falta de ganancia de peso, albuminuria y glucosuria. Al excluir la leche de la dieta, estos signos y síntomas desaparecieron, sin embargo, posterior a la ingesta de lactosa o galactosa presentaba galactosuria dosis-dependiente. Tanto el hermano mayor como el menor presentaron ictericia, hepatomegalia y murieron a las 4 semanas de vida. Goppert concluyó que estos pacientes sufrían de un padecimiento hepático familiar en el que la lactosa debía ser substituido por otro tipo de carbohidrato<sup>1</sup>. Desde entonces, numerosas publicaciones han detallado los signos y síntomas del padecimiento conocido como galactosemia "clásica"<sup>2</sup>.

En 1956 se determinó que la enzima deficiente en los pacientes afectados por galactosemia es una transferasa<sup>3</sup> capaz de catalizar la conversión de galactosa en galactosa-1-fosfato, la cual posteriormente se convertirá en glucosa-1-fosfato. El seguimiento de la evolución de pacientes con galactosemia inició en la década de los 80<sup>4</sup>. Finalmente, en 1990, se conoció la secuencia del cDNA codificante de la galactosa-1-fosfato uridiltransferasa<sup>5</sup>.

### **FRECUENCIA**

La galactosemia es un error del metabolismo clínicamente heterogéneo. Es un padecimiento autosómico recesivo cuya incidencia se estima en dos casos por

cada 100,000 recién nacidos vivos, con una mortalidad neonatal que puede llegar hasta el 20%<sup>6</sup>.

## FISIOPATOLOGÍA

La galactosa y la glucosa son absorbidas en el intestino por un sistema acoplado a sodio y dependiente de energía<sup>7</sup>. En individuos normales las cargas de galactosa son absorbidas y eliminadas de la sangre rápidamente<sup>8</sup>. Evolutivamente la glucosa ha emergido como la principal fuente de energía gracias a su estabilidad y al potencial limitado para la glucosilación de proteínas. La galactosa no cuenta con estas propiedades, por lo que la rápida conversión de galactosa a glucosa es necesaria<sup>9</sup>.

En la mayoría de los organismos, la conversión de la  $\beta$ -D-galactosa a la forma útil de glucosa 1-fosfato se lleva a cabo por la acción de las 4 enzimas que constituyen la vía Leloir o vía principal del metabolismo de la galactosa. En el primer paso, la  $\beta$ -D-galactosa es epimerizada a  $\alpha$ -D-galactosa por medio de la galactosa mutarotasa. El siguiente paso involucra la fosforilación dependiente de ATP de la  $\alpha$ -D-galactosa por la galactocinasa (GALK) para dar lugar a la galactosa-1-fosfato. La tercera enzima de la vía, la galactosa 1-fosfato uridiltransferasa (GALT), cataliza la transferencia de un grupo uridil-monofosfato de la uridil fosfato-glucosa (UPD-Glc) a la galactosa-1-fosfato, generando glucosa 1-fosfato y uridil fosfato-galactosa (UPD-Gal). Para completar la vía, la UPD-Gal es convertida a UPD-Glc por la UPD-galactosa 4-epimerasa (GALE). La UDP-Gal es un cofactor esencial para las galactosa-transferasas que se encuentran

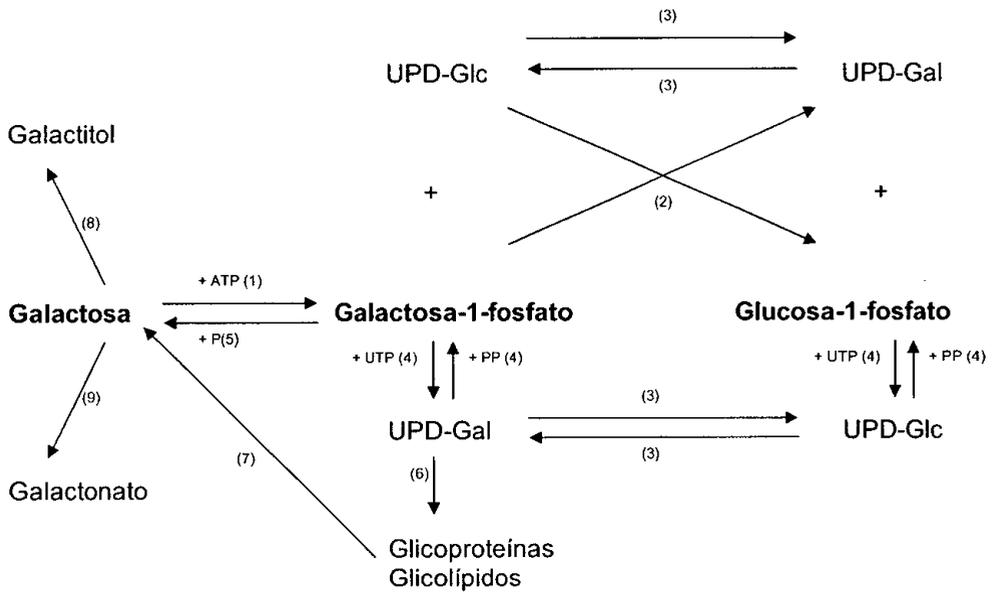
involucradas en la incorporación de galactosa a glicoproteínas y glicolípidos. En los humanos, defectos en los genes que codifican para GALK, GALT o GALE dan lugar a la enfermedad referida colectivamente como galactosemia <sup>10</sup>.

La enzima involucrada en la galactosemia clásica es GALT. Esta proteína funciona como homodímero<sup>11</sup>. En la primera parte de la reacción, un residuo de histidina en el sitio activo (His-186) sirve como nucleófilo, atacando el fósforo- $\alpha$  de la UPD-Glc. Una molécula de Glc-1-P es liberada, dejando un intermediario uridilado de la enzima. En la segunda parte de la reacción, Gal-1-P entra a la hendidura del sitio activo y ataca al nitrógeno uridilado en el anillo imidazol del sitio activo de histidina, produciendo UPD-Gal. Este segundo producto se disocia, regenerándose enzima libre<sup>12</sup> (Fig. 1). La enzima tiene una cinética conocida como "ping-pong"<sup>13</sup> (Fig. 2).

Los niveles de GALT en eritrocitos de pacientes afectados con galactosemia clásica son prácticamente nulos, por lo que las manifestaciones son muy severas<sup>14</sup>. Cuando el cuadro clínico de la galactosemia es leve o se obtienen resultados positivos para esta enfermedad por medio de la prueba de tamiz metabólico, generalmente, los pacientes son heterocigotos compuestos para una mutación que condiciona galactosemia y para la variante Duarte (G/D), con deficiencia parcial de GALT<sup>15</sup>.

**FIGURA 1**

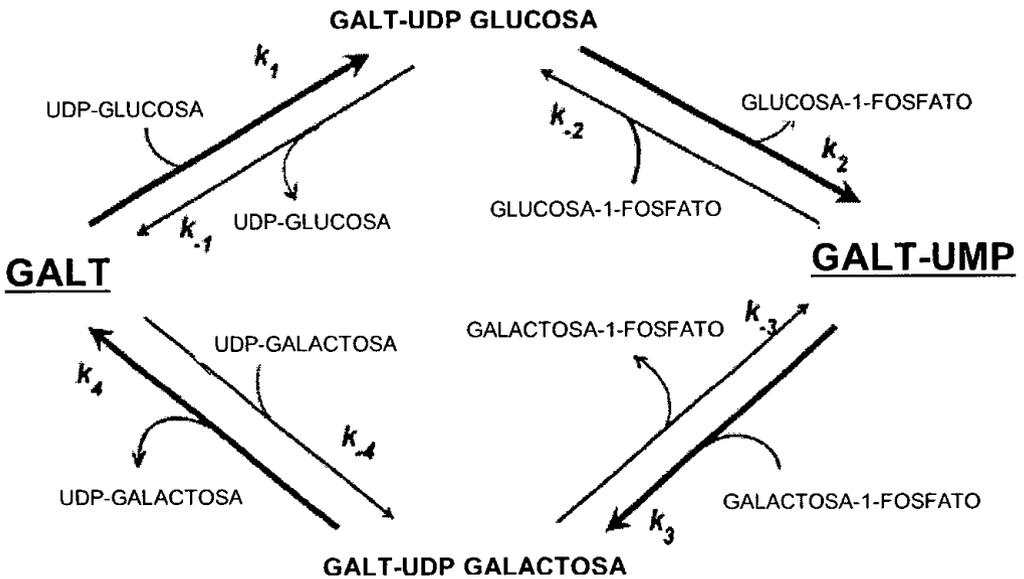
**VÍA METABÓLICA DE LA GALACTOSA**



- (1) Galactocinasa, (2) Galactosa-1-fosfato uridiltransferasa, (3) Galactosa-4-epimerasa, (4) UDP-Glc pirofosforilasa, (5) UDP-Gal pirofosforilasa, (6) Galactosiltransferasa, (7) Reserva de galactosa libre, (8) Aldosa reductasa, (9) Galactosa deshidrogenasa.

FIGURA 2

REACCIÓN PING-PONG DE GALT<sup>13</sup>



Reacción reversible catalizada por GALT, donde los grupos no equivalentes funcionalmente se tornan equivalentes vía una reacción intermedia o producto. La reacción en el  $\alpha$ -fósforo de la UDP-glucosa, claramente demuestra que esta enzima tiene un mecanismo de reacción "ping-pong" a partir del cual se forma un intermediario covalente uridil-enzimático.

La deficiencia completa de GALT tiene un efecto profundo sobre varias vías metabólicas, especialmente cuando la ingesta de galactosa continúa. La galactosa por sí sola se acumula en distintos tejidos y la sangre. El aumento en la concentración de galactitol es una característica común en este padecimiento y ha sido implicado en la formación de cataratas oculares galactosémicas<sup>16</sup>. Dado que la conversión de la galactosa a galactitol por la aldolasa reductasa representa uno de los finales de la vía metabólica, los productos producidos por las vías alternas de la galactosa, el galactitol y el ácido galactónico, tienen que ser removidos exclusivamente por la vía renal<sup>17</sup>, sin embargo también tienden a acumularse en diversos tejidos.

Aunque el hígado es el órgano principal en donde se efectúa el metabolismo de la galactosa, las enzimas de la vía Leloir se han encontrado en varios tipos celulares y tejidos. La GALT y la GALK están presentes en los eritrocitos fetales, hígado, pulmón, bazo y músculo cardíaco a partir de la semana 10 de gestación y su actividad es mayor en el segundo y tercer trimestre que en la etapa postnatal<sup>18</sup>. Esto sugiere la posibilidad de que el daño puede ocurrir *in utero* ante la deficiencia de GALT; con la transferencia materno-fetal de galactosa por la misma vía que sigue la glucosa, al existir aumento en la concentración de galactosa en sangre materna podrían causar su elevación en el feto, de modo que si éste es homocigoto, se acumularía galactosa-1-fosfato y galactitol en sus tejidos. Por esto, algunos autores aconsejan que las madres homocigotas o heterocigotas para alelos mutados sigan una dieta exenta de galactosa durante el embarazo con el fin de mejorar el pronóstico fetal<sup>19</sup>.

## CUADRO CLÍNICO

El defecto enzimático produce en el neonato alimentado al seno materno o con fórmula maternizada una gama de signos y síntomas graves que pueden llevarlo a la muerte en pocos días. Los síntomas iniciales incluyen rechazo al alimento con poca ganancia de peso, vómito, diarrea, letargia e hipotonía. A la exploración física el niño se observa icterico, en algunas ocasiones con catarata congénita, con hepatomegalia y puede presentarse sangrado prolongado posterior a las venopunciones o procedimientos sencillos. La disfunción hepática suele comenzar con cambios inflamatorios o infiltración grasa del hígado, para evolucionar hacia cirrosis. Los estudios de la investigación inicial reportan hiperbilirrubinemia no conjugada o mixta, aumento de las transaminasas hepáticas, aumento de aminoácidos en plasma (especialmente fenilalanina, metionina y tirosina), tubulopatía renal (acidosis metabólica, galactosuria, glucosuria, albuminuria y aminoaciduria). Además, las anomalías hemorrágicas son comunes secundarias a la hepatopatía.

Durante la primera semana de vida, muchos neonatos con la forma aguda de galactosemia tienen infección por *Escherichia coli* u otras bacterias gram negativas. Esta susceptibilidad a infecciones se relaciona con una disminución en la actividad fagocitaria y bactericida leucocitaria<sup>20</sup> por la elevación en la concentración sanguínea de galactosa y por el déficit de la transferasa leucocitaria<sup>6</sup>.

Se ha postulado que la acumulación de galactitol es responsable de la mayoría de los efectos tóxicos sistémicos y del deterioro neurológico. La síntesis anormal de glicolípidos parece que también contribuye a la alteración de la función cerebral.

Además, la elevación de la galactosa en la sangre puede inhibir la captación de la glucosa por el sistema nervioso central, así como una defectuosa conversión de la glucosa en inositol y la secundaria disminución de ATP neuronal<sup>21</sup>.

Estudios con resonancia magnética nuclear han demostrado disminución de la materia blanca como resultado de una mielinización deficiente producida por la alteración primaria de la estructura de la mielina, ya que el 40% de esta sustancia es compuesta de galactocerebrósidos<sup>22</sup>.

La sintomatología inicial desaparece dramáticamente al restringir totalmente la galactosa de la dieta, sin embargo, a pesar del buen apego a la dieta, los niños con galactosemia clásica tienen una morbilidad significativa en los siguientes años de la vida, condicionada por bajo desarrollo cognitivo, ataxia y, en mujeres, falla ovárica.

## DIAGNÓSTICO

La prueba de Beutler es un estudio cualitativo que determina la presencia de la actividad de GALT; actualmente es ampliamente utilizada para realizar el diagnóstico neonatal de galactosemia clásica<sup>23</sup>. Pueden ocurrir resultados falsos negativos cuando el paciente ha sido transfundido durante los últimos 3 meses así como resultados falsos positivos en pacientes con deficiencia de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.

La determinación de GALT en eritrocitos es un ensayo cuantitativo que confirma el diagnóstico. También es capaz de identificar variantes del padecimiento con actividad enzimática residual<sup>24</sup>.

Las concentraciones de galactosa-1-fosfato siempre se encuentran elevadas en pacientes con galactosemia clásica y no se ven significativamente afectadas por transfusiones sanguíneas<sup>25</sup>.

La presencia de sustancias reductoras de azúcares o galactosa en orina no se considera un resultado sensible ni específico, ya que pequeñas cantidades de galactosa son excretadas en la orina de pacientes con daño hepático o tubular, además de que la galactosa puede desaparecer rápidamente en la orina de los pacientes con galactosemia a las pocas horas de retirar el disacárido de la dieta<sup>19</sup>.

## TRATAMIENTO Y MANEJO

En los pacientes con datos clínicos que apoyen el diagnóstico de galactosemia o en aquellos detectados por medio del tamiz neonatal con sintomatología, la galactosa debe excluirse inmediatamente de su dieta; se recomienda que para ello no se deba esperar hasta tener los resultados de los análisis diagnósticos. Por lo tanto, la alimentación al seno materno y las fórmulas maternizadas deben suspenderse; las fórmulas a base de soya son las más adecuadas a menos de que el paciente curse con hepatopatía severa, en cuyo caso se recomienda una fórmula con triglicéridos de cadena media e hidrolizado de caseína (Pregestimil™) hasta que el cuadro se resuelva. Los hidrolizados de caseína contienen una pequeña cantidad de galactosa, por lo que en ausencia de hepatopatía no es la fórmula de primera elección.

Los niños críticamente enfermos deberán ser manejados con medidas de soporte adecuadas a la severidad de la hepatopatía, nefropatía y alteraciones de sistema nervioso central. La administración de antibióticos, fluidos intravenosos, plasma y

vitamina K son requeridos con frecuencia. La ictericia usualmente no es tan severa como para requerir fototerapia o exanguineotransfusión, sin embargo, aquellos pacientes con bajos niveles de albúmina secundarios a la hepatopatía pueden estar en riesgo de presentar kernicterus. Para evitar resultados falsos negativos en los análisis enzimáticos, todas las muestras de sangre y orina deben tomarse antes de realizar cualquier transfusión.

Aquellos neonatos en riesgo de padecer galactosemia, por ejemplo, los hermanos de pacientes diagnosticados, no deben ser alimentados al seno materno o con fórmula hasta que se haya excluido en ellos el diagnóstico de galactosemia.

Los lactantes sin riesgo y con buen estado de salud pero con resultado positivo para galactosemia en el tamiz neonatal deberán ser evaluados cuidadosamente en búsqueda de signos o síntomas del padecimiento. Estos casos pudieran ser resultado de una deficiencia parcial de GALT, ya que éstas pueden ser hasta 10 veces más comunes que la galactosemia clásica<sup>15</sup>. La necesidad de intervención en estos pacientes es aún desconocida.

El tratamiento a largo plazo en los pacientes con galactosemia clásica sintomática se basa en la eliminación de la galactosa de la dieta, lo que en esencia significa la restricción definitiva de leche y lácteos en general ya que la ingesta del disacárido tiene efectos tóxicos a cualquier edad. La leche materna y las fórmulas maternizadas están contraindicadas. A pesar de estas medidas, la dieta aún puede contener pequeñas cantidades de galactosa presente en frutas, verduras y ciertas leguminosas como los chícharos y frijoles<sup>26</sup>, sin embargo, algunos autores no justifican su restricción<sup>27</sup>. La ingesta de vísceras está prohibida.

Un gran número de medicamentos contienen lactosa, por lo que debe revisarse su composición antes de prescribirlos a pacientes con galactosemia. Esto es especialmente importante con las tabletas masticables de uso pediátrico. Sin embargo, la dosis total es pequeña en comparación con la producción endógena de galactosa<sup>28</sup>, particularmente si el medicamento no se administra por un periodo prolongado.

Las fórmulas con base en soya contienen cantidades adecuadas de calcio, sin embargo su ingesta tiende a disminuir en los lactantes a partir del año de edad, por lo que es necesario administrar suplementos de sales de calcio libres de lactosa o cambiar a leche de soya rica en calcio para cumplir con los requerimientos de este mineral y así, evitar disminución de la densidad ósea que puede agravarse por la falla ovárica<sup>29</sup>.

## SEGUIMIENTO Y MONITORIZACIÓN

La determinación de las concentraciones eritrocitarias de Gal-1-P es el método más usado para la monitorización del apego a la dieta. La concentración de este metabolito se encuentra muy elevada al momento del diagnóstico y es esencial demostrar su disminución hasta niveles aceptables después de instaurar la dieta. Los rangos límite de concentración varían entre los laboratorios de acuerdo a la metodología utilizada<sup>2</sup>:

- $\mu\text{mol/L}$  eritrocitos: 150
- $\mu\text{g/mL}$  de paquete globular: 50
- $\text{mg}/100 \text{ mL}$ : 5
- $\mu\text{mol/g}$  hemoglobina: 0.5

En pacientes con galactosemia clásica, a pesar del apego a la dieta, las concentraciones de Gal-1-P nunca disminuyen hasta cifras de pacientes sanos (cerca de 0).

La monitorización a largo plazo de pacientes con galactosemia clásica a través de la determinación de Gal-1-P puede resultar injustificada; su costo es elevado y las cifras sólo reflejan la ingesta de galactosa en las últimas 24 horas; no se ha demostrado su total correlación con el pronóstico clínico a largo plazo. Walter y colaboradores sugieren el siguiente esquema de monitorización<sup>2</sup>:

- < 1 año, cada 3 meses.
- 1-14 años, cada 6 meses.
- >14 años, anual.

Por otro lado, la determinación de la concentración de galactitol urinario no ha demostrado su utilidad en el seguimiento de los pacientes con galactosemia clásica.

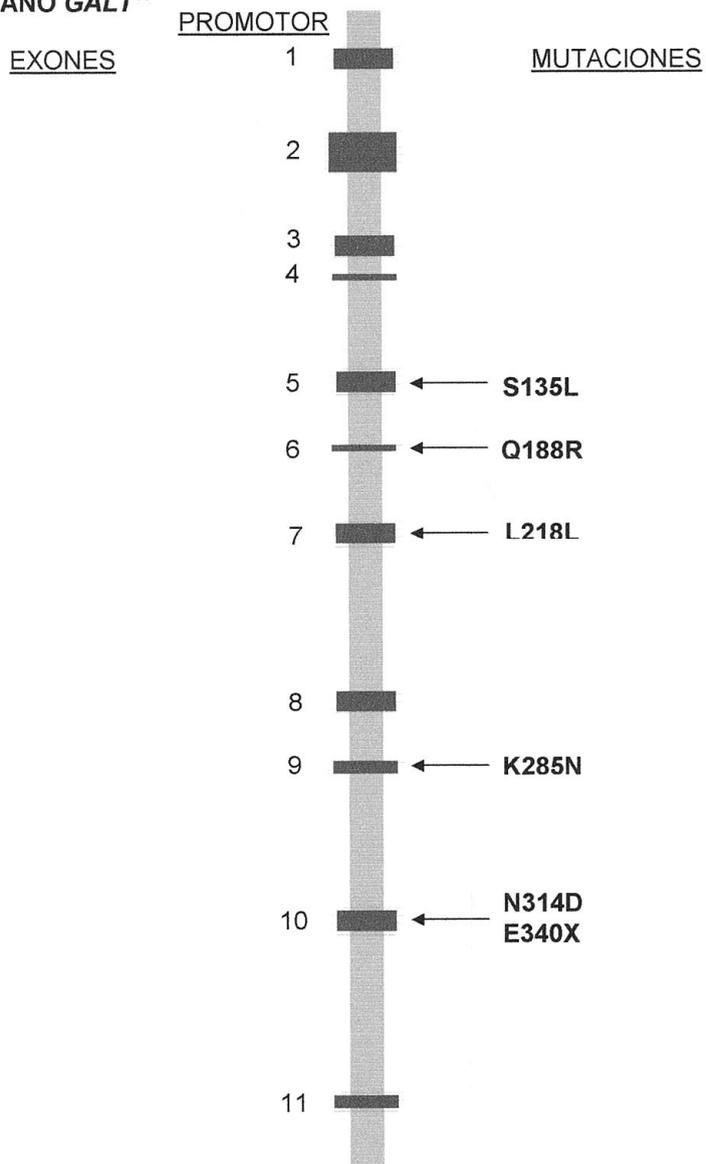
## GEN

El gen de la enzima GALT se localiza en el cromosoma 9p13<sup>30</sup>. Tiene una longitud de 3900 pares de bases y codifica para un polipéptido de 379 aminoácidos con una masa estimada de 43 kilodaltones. El gen es relativamente pequeño y se organiza en 11 exones con 10 intrones (Fig. 3). Algunos exones contienen secuencias altamente conservadas a través de la evolución. El promotor localizado en la región 5' del gen contiene dos sitios ricos en GC, tres secuencias AP-1 y una secuencia CCAAT. No tiene caja TATA consenso, por lo tanto, se

considera un gen "housekeeping", pero contiene dominios reguladores que pudieran jugar un papel en la expresión tejido-específica y desarrollo-específica<sup>31</sup>.

**FIGURA 3**

**ESTRUCTURA, ORGANIZACIÓN Y MUTACIONES MAS FRECUENTES DEL GEN HUMANO *GALT*<sup>16</sup>**



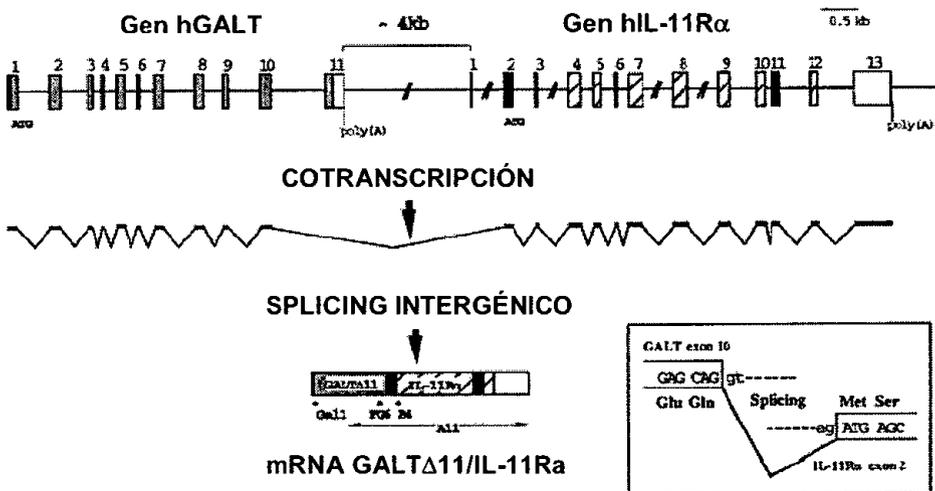
## mRNA

Un mRNA sencillo de 1.4-kb se ha identificado y su cDNA correspondiente codifica una proteína de 43-kDa. El marco de lectura abierto inicia con la tripleta ATG en el sitio 29 y termina con un codón de paro TGA en la base 1166. Tiene un sitio poli(A) y splicing de fusión de 2 genes adyacentes, que codifican para GALT y para el receptor de la cadena- $\alpha$  de la interleucina 11 (IL-11R $\alpha$ ) en células humanas normales. Esta unidad de transcripción de 16-kb contiene 2 promotores (el primero constitutivo y el segundo, a 8kb río abajo, altamente regulado) y 2 señales de hendidura/poliadenilación separadas por 12 kb. Dos mRNA son generados a partir del promotor *GALT*, un mRNA de 1.4-kb que codifica para GALT y un mRNA de fusión de 3-kb que codifica una porción de GALT y la cadena completa de IL-11R $\alpha$ . Este evento sucede cuando el primer sitio poli(A) es cortado y empalmado y el segundo sitio poli(A) es utilizado. La existencia del transcrito de fusión probablemente es secundaria a la hendidura/poliadenilación deslizante en el sitio poli(A) de *GALT* y a un evento de splicing alternativo entre el sitio donador de *GALT* en el exón 10 y el sitio aceptor de *IL-11R $\alpha$*  en el exón 2 (Fig. 4). El significado biológico del mRNA de fusión aún no se ha aclarado<sup>32</sup>.

FIGURA 4

EVENTOS DE SPLICING INTERGÉNICOS ENTRE LOS GENES HUMANOS

GALT E IL-11R $\alpha$ <sup>17</sup>



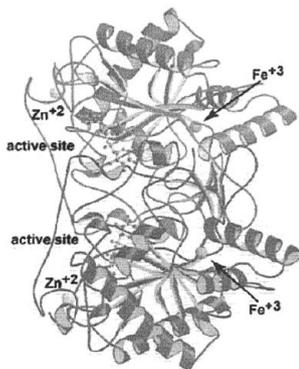
PROTEÍNA

Se trata de un homodímero, cuyas subunidades contienen 348 residuos de aminoácidos y adicionalmente uno de zinc y uno de hierro. El plegamiento de la subunidad se describe como “medio barril” con nueve hebras- $\beta$  antiparalelas flanqueadas a ambos lados por  $\alpha$ -hélices.<sup>33</sup> El hierro sirve como puente al unir 2 hebras- $\beta$  y un  $\alpha$ -hélice cerca del espacio subunidad-subunidad del dímero<sup>5</sup>. El ion de zinc se localiza a 8Å del sitio activo y se une como tetraedro por Cys-52, Cys-

55, His-115 a His-164, sin embargo, de acuerdo al alineamiento de la secuencia de aminoácidos, aparentemente en organismos superiores, Cys-52 e His-115 no se encuentran conservados, sugiriendo que algunas uridiltransferasas no se unen a dicho metal. El sitio activo de la uridiltransferasa se forma por residuos de aminoácidos aportados por ambas subunidades del homodímero <sup>34</sup> (Fig. 5).

## FIGURA 5

### REPRESENTACIÓN DE GALT DE *E. COLI*



Las 2 subunidades de la enzima dimerica se presentan en azul y rojo con la posición de los metales indicada por esferas. El sitio activo de este modelo contiene unida UDP-glucosa<sup>5</sup>.

## MUTACIONES

Hasta el año 2006 se han documentado 165 mutaciones y 11 polimorfismos en el gen *GALT*<sup>35</sup>. Cerca del 9% son mutaciones sin sentido, pequeñas deleciones o inserciones 10% y mutaciones en el sitio de splicing 5%, por lo que la mayoría de las mutaciones son de sentido erróneo que se presentan a todo lo largo del gen<sup>36</sup>.

De éstas, 29 ocurren en sitios CpG hipermutables y dos terceras partes son transiciones C→T, que ocurren en ambas hebras (Fig. 6).

En el caso de la mutación Q188R, el cambio de glutamina por arginina en la posición 188 de la proteína GALT, resulta de la transición CAG>CGG en el exón 6. Es la mutación más prevalente a nivel mundial, con una frecuencia de 60 a 70% en caucásicos norteamericanos<sup>37</sup> y en latinos de 50-58%<sup>38</sup>. Esta mutación se localiza en un dominio altamente conservado entre especies y se encuentra muy cerca del sitio catalítico de la enzima, la región histidina-prolina-histidina; la unión usual del hidrógeno entre la glutamina y la histidina en el sitio activo de la enzima se compromete por la sustitución de arginina por glutamina, desestabilizando el complejo UMP-GALT<sup>39</sup>.

En la mutación K285N, la sustitución de lisina por aspartato en el exón 9, resulta de la transversión AAG>AAT en el nucleótido 855. La sustitución del aminoácido no sucede en un dominio de la proteína tan conservado entre especies y sus efectos están aún por determinarse. Globalmente dicha mutación es mucho más rara que la Q188R, sin embargo, es la segunda más frecuente<sup>40</sup>. Existe gran variación de su prevalencia en distintas poblaciones pero en Europa suma en total entre el 25 y 35% de los alelos mutados<sup>19</sup>.

Para la mutación N314D el cambio de aspartato por asparragina está dictada por la transición AAC>GAC. Inicialmente se pensaba que esta mutación era un polimorfismo, sin embargo, ahora se sabe que está asociada con los alelos Duarte<sup>41</sup> que se encuentran en el exón 10. La variante Duarte (D o D2) se caracteriza por presentar actividad enzimática reducida<sup>42</sup>, mientras que la variante Los Angeles (LA o D1), a pesar de tener isoformas y reacciones inmunoquímicas

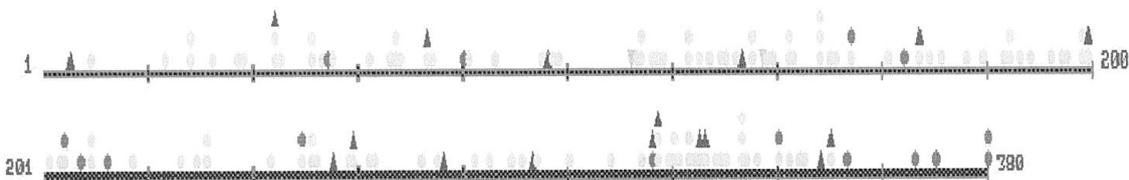
idénticas a las de D2, se asocia con actividad enzimática aumentada cuando se compara con controles<sup>43</sup>. Diversos estudios *in vitro* han demostrado que la mutación N314D no afecta la actividad de GALT<sup>44 45</sup>. N314D se encuentra en desequilibrio de ligamiento con otros cambios de base distintos de los alelos D1 y D2. La mutación "silenciosa" L218L, producida por la transversión CTA>TTA localizada en el exón 7, coexiste con N313D en D1, pero no en los alelos D2, mientras que los polimorfismos intrónicos IVS4nt-27g→c, IVS5nt-24g→a y IVS5nt+62g→a se encuentran en desequilibrio de ligamiento con N134D en los alelos D2<sup>46</sup>. En raras ocasiones, N314D se puede encontrar *en cis* en cromosomas de galactosemia que poseen otras mutaciones bien reconocidas. Por ejemplo, en Alemania todos los cromosomas de galactosemia que poseen la mutación E340X ocurren *en cis* con N314D/L218L, mientras que la mutación W316X se encuentra exclusivamente en cromosomas que poseen N314D y polimorfismos intrónicos<sup>47</sup>.

Como en otras patologías con alta heterogeneidad genética, por ejemplo, fibrosis quística y fenilcetonuria, pocas mutaciones en el gen *GALT* son frecuentes en todas las poblaciones. Las mutaciones que con mayor frecuencia se han reportado a nivel mundial son Q188R, K285N, N314D y S135L, siendo la última prácticamente exclusiva de la raza negra<sup>48</sup>. Este cambio de sentido erróneo C→G en el codón 135 produce la sustitución de serina por lisina y es altamente prevalente sólo en el sur de África y sugiere que sus habitantes negros fueron una fuente de esclavos para América del Norte. La deriva génica y la expansión pudieron haber contribuido también con la alta frecuencia de la mutación S135L en afro-americanos.

Existe una distribución particular de las mutaciones comunes de *GALT* entre los distintos grupos étnicos. La variante Duarte (N314D) se encuentra en todas las poblaciones y su prevalencia se encuentra entre 6-20% de los alelos “normales” de *GALT*<sup>49</sup> (Tabla 1).

## FIGURA 6

### MAPA DE MUTACIONES DE *GALT*<sup>50</sup>



- Mutación de sentido erróneo
- Mutación sin sentido
- ▲ Delección
- ▼ Inserción

**TABLA 1**

**PREVALENCIA DE LAS MUTACIONES Q118R, K285N, N314D Y S135L EN DISTINTAS POBLACIONES <sup>51, 52</sup>**

<i><b>MUTACIÓN</b></i>	<i><b>POBLACIÓN</b></i>	<i><b>FRECUENCIA</b></i>
<b>Q188R</b>	EE.UU. Caucásicos	60-70%
	EE.UU. Descendencia Europea	63.5%
	EE.UU. Hispanos	50-58%
	EE.UU. Afroamericanos	12-21%
	Europa	64%
	Turquía	57%
	Viajeros de Irlanda	100%
	Japón	-----
<b>K285N</b>	Europa Central	25-35%
	Japón	-----
<b>N314D</b>	EE.UU	6-20%
	EE.UU. población no galactosémica	5-6%
	Japón	2%
<b>N314D/L218L</b>	Alemania	5.4%
<b>N314D/IVS4/IVS5</b>	Alemania	9.5%
<b>S135L</b>	Población Afro-Americana	50%
	Población negra de Sudáfrica	91%

## RELACIÓN FENOTIPO-GENOTIPO

A pesar de que sólo 2 o 3 mutaciones se encuentran hasta en el 80% de los pacientes galactosémicos, se han identificado más de 160 mutaciones, lo que sugiere que la variabilidad fenotípica puede ser explicada por la heterogeneidad alélica.

Los pacientes homocigotos para la mutación Q188R tienen prácticamente niveles indetectables de actividad enzimática en eritrocitos y linfocitos, hallazgo que es compatible con la localización de la mutación en un dominio altamente conservado entre las especies y en proximidad con el sitio catalítico de la enzima<sup>53</sup>.

La mutación K285N se asocia invariablemente a pérdida total de la actividad de GALT eritrocitaria y, por lo tanto, un fenotipo bioquímico severo<sup>54</sup>.

Los pacientes homocigotos para la mutación N314D tienen el 50% de la actividad de GALT, pero no por reducción en la transcripción del mRNA, sino por inestabilidad térmica de la enzima que produce disminución en la vida media de la misma<sup>55</sup>. La misma mutación sin sentido puede tener actividad enzimática normal en algunos pacientes y es conocida como variante Los Angeles (LA). Los efectos compuestos de mutaciones adicionales *en cis* con el alelo N314D son variables y probablemente influenciados por el tipo y posición de la segunda mutación. Tanto D1 como D2 han sido implicados como causa de infertilidad en mujeres con defectos de canalización a nivel genital<sup>56</sup>.

Los pacientes homocigotos para la mutación S135L carecen de actividad enzimática de GALT en eritrocitos y linfoblastos, sin embargo, los leucocitos presentan actividad del 10% del alelo silvestre, lo que sugiere que pudiera existir actividad enzimática residual en hígado. Esta diferencia en la expresión de GALT

en diversos tejidos sugiere la combinación de catálisis defectuosa y estabilidad enzimática dependiente del órgano o tejido involucrado. El pronóstico a largo plazo de estos pacientes es bueno al compararlo con el de pacientes homocigotos para la mutación Q188R<sup>57</sup>.

Muchos autores han correlacionado el fenotipo bioquímico, determinando la actividad de GALT en eritrocitos, con las distintas mutaciones obteniendo resultados significativos<sup>58</sup>, sin embargo, los intentos para determinar los efectos de las mutaciones con relación a las complicaciones a largo plazo no han sido exitosos. Un estudio sugiere que la homocigocidad para Q188R es un factor determinante para un pronóstico clínico pobre<sup>59</sup>, mientras otro ha expuesto que no existe diferencia estadísticamente significativa en el pronóstico a largo plazo de individuos galactosémicos homocigotos-Q188R, heterocigotos-Q188R o no-Q188R<sup>60</sup>. Desafortunadamente, la correlación fenotipo-genotipo en la galactosemia clásica ha sido difícil de establecer a pesar de contar con estudios con grandes series de pacientes<sup>61</sup>, probablemente por que muchos pacientes son diagnosticados de manera tardía, cuando los altos niveles de galactosa han producido daño a nivel cerebral y hepático, principalmente<sup>62</sup>.

Aparentemente la mutación K285N, es la mutación que con mayor frecuencia se ha asociado a la aparición de catarata presenil idiopática en portadores de alelos de galactosemia clásica; mientras que no se ha logrado establecer una relación con el alelo D2, probablemente por que los heterocigotos para la variante Duarte tienen actividad enzimática del 75%, la cual es demasiado alta para conducir a la formación de catarata presenil<sup>63</sup>.

## PRONÓSTICO

La patogenia de las complicaciones crónicas en galactosemia clásica es compleja y poco conocida. La severidad de las alteraciones neonatales es probablemente la variable más importante en el pronóstico.

El crecimiento generalmente se encuentra retrasado en la mayoría de los pacientes, pero la talla final no varía de manera significativa con relación a la población general, sin embargo, las mujeres afectadas tienen más tendencia a la talla baja<sup>20</sup>.

El bajo coeficiente intelectual de algunos pacientes diagnosticados y tratados oportunamente, pudiera explicarse por la transferencia materno-fetal de galactosa por la misma vía que la glucosa, por lo que la elevación de galactosa en la madre, podría causar elevación en el feto; si éste es homocigoto para mutaciones bioquímicamente severas en el gen *GALT*, se acumulará galactosa-1-fosfato y galactitol en sus tejidos<sup>64</sup>. Un segundo postulado involucra la producción endógena de galactosa que intoxica continuamente el sistema nervioso central<sup>65</sup>.

En las mujeres homocigotas o heterocigotas para mutaciones bioquímicamente severas se ha descrito falla ovárica primaria con frecuencia y es una complicación independiente de la edad en la que se instaura el tratamiento o del apego a éste<sup>66</sup>.

Se puede manifestar con pubertad retrasada, amenorrea primaria o secundaria o con oligomenorrea. Se desconoce su fisiopatología pero se sugiere que el daño inicia en la etapa prenatal por el efecto tóxico directo de la galactosa<sup>67</sup>.

## JUSTIFICACIÓN.

Los estudios moleculares para mutaciones comunes en aquellos pacientes con resultados bioquímicos positivos para entidades autosómicas recesivas han sido utilizados para brindar asesoramiento genético de certeza, realizar diagnóstico prenatal e identificar a portadores del padecimiento dentro de las familias de los pacientes afectados.

El conocer la frecuencia y tipo de mutaciones que condicionan la galactosemia clásica en la población mexicana, permitiría incluir la genotipificación al tamiz neonatal ampliado, con el fin de establecer el tratamiento adecuado para cada paciente y así evitar secuelas y realizar prevención en otros miembros de la familia.

En un futuro, además, permitiría realizar la búsqueda de mutaciones responsables de galactosemia clásica en otro grupo de padecimientos, como aquellos con defectos de canalización genital, infertilidad femenina o presencia de catarata presenil aislada, en los cuales se ha demostrado que un porcentaje de ellos son causados por mutaciones de *GALT* en estado heterocigoto.

Por lo tanto, la creación de un sistema que brinde estas ventajas es de gran beneficio para los pacientes y familias afectadas por la galactosemia clásica, pudiendo prevenir su curso potencialmente letal y la morbilidad en los sobrevivientes y heterocigotos.

## **OBJETIVOS.**

### **I. OBJETIVO GENERAL**

1. Describir las características clínicas y conocer la frecuencia de las mutaciones más comunes en el gen de la galactosa-1-fosfato uridiltransferasa en pacientes del Instituto Nacional de Pediatría con galactosemia clásica y sus familiares.

### **II. OBJETIVOS PARTICULARES**

1. Describir las características clínicas de los pacientes con diagnóstico confirmado de galactosemia clásica.

2. Identificar mediante amplificación de DNA por PCR y corte con endonucleasas de restricción las mutaciones Q188R, K285N y N314D del gen *GALT*.

3. Identificar mediante amplificación de DNA alelo específica la mutación S135L del gen *GALT*.

4. Identificar portadores de las mismas mutaciones en los familiares de primer grado de los pacientes.

## **DISEÑO DEL ESTUDIO.**

Es un estudio observacional, descriptivo, transversal, prospectivo.

## **MATERIAL Y MÉTODOS.**

### **CRITERIOS DE INCLUSIÓN**

- a) Pacientes con diagnóstico confirmado de galactosemia clásica.
- b) Cualquier género.
- c) Cualquier edad.
- d) Familiares en primer grado (padres y hermanos) de pacientes con diagnóstico confirmado de galactosemia clásica.
- e) Firma de carta de consentimiento informado para casos índice y familiares.  
(Anexo 1).

### **CRITERIOS DE EXCLUSIÓN**

- a) Padres o hermanos no biológicos de los casos índice.
- b) Pacientes transfundidos en un periodo menor a tres meses (se excluirán de manera temporal).

### **POBLACIÓN OBJETIVO:**

Pacientes mexicanos con diagnóstico confirmado de galactosemia clásica por la ausencia de actividad enzimática de GALT documentada por una prueba de Beutler negativa y/o ausencia de GALT en el tamiz neonatal plus ampliado, así como presencia de galactosuria en prueba cualitativa y/o cifras de galactosa total en sangre mayores a 14 mg/dL.

## **POBLACIÓN ELEGIBLE:**

Casos canalizados a través de la Unidad de Genética de la Nutrición-IIB-UNAM-INP con diagnóstico confirmado de galactosemia clásica realizado de 1990 a 2006, así como sus familiares en primer grado.

## **DESCRIPCIÓN GENERAL DEL ESTUDIO.**

Los pacientes se captaron a través de los servicios de consulta externa y/u hospitalización y se contactó vía telefónica a aquellos diagnosticados en la unidad de Genética de la Nutrición en años anteriores para que participaran en el estudio. Fueron evaluados por los servicios de la Unidad de Genética de la Nutrición y el Departamento de Investigación en Genética Humana del INP. A las familias se les realizó historia clínica completa con árbol genealógico y en ella se asentaron los resultados de los estudios enzimáticos de GALT y/o galactosa en orina y/o sangre. En cada caso se asentaron los datos clínicos de las variables a analizar en la Hoja de Captación de Datos (Anexo 2).

### **a) Creación del banco de DNA:**

Para el estudio molecular del gen *GALT* se obtuvo el DNA genómico mediante la técnica de precipitación salina con el kit Puregene™ (Gentra Systems, Minneapolis, MN, USA) a partir de leucocitos de sangre periférica con EDTA como anticoagulante (3-5 mL), muestras de tamiz neonatal en tarjetas de Guthrie o de células de descamación de mucosa oral, tanto del caso índice como de sus familiares en primer grado (padres y hermanos). El DNA genómico obtenido se cuantificó y se valoró su pureza e integridad mediante

espectrofotometría y electroforesis en gel de agarosa. Las muestras de DNA se conservaron a 4°C hasta su análisis.

b) Búsqueda de las mutaciones Q188R, K285N, N314D y S135L en el gen *GALT*:

Las 3 primeras mutaciones se identificaron mediante amplificación de las secuencias de los exones 6, 9 y 10, respectivamente, por medio de PCR y corte con endonucleasas de restricción.

Los primers de cada secuencia se enlistan a continuación<sup>55</sup>.

<b>ALELO</b>	<b>PRIMER F</b>	<b>PRIMER R</b>
<b>Q188R</b>	5'AAGCTTTGGTT CTGGGGAGT 3'	5'AATGGATGGGA CAGAGGAAA 3'
<b>K285N</b>	5'GATGGAGGTT GCTCCCAGTA 3'	5'ACCTGATACTT CTGTTGCCCTTG TGCT 3'
<b>N314D</b>	5'ACTGTAAAAG GGCTCTCTCTC C 3'	5'TTGGCTACGAA ATGCTTGC3'

La amplificación del DNA para el análisis de las mutaciones Q188R y N314D se llevó a cabo con las siguientes condiciones: Ciclo 1: desnaturalización a 95°C por 5 minutos, alineamiento a 59°C por 1 minuto, extensión a 72°C por 1 minuto. De los ciclos 2 a 34: 95°C por 1 minuto, 59°C por 40 segundos y 72°C por 1 minuto. Ciclo 35: 95°C por 1 minuto, 59°C por 1 minuto y 72°C por 10 minutos. La amplificación de DNA del exón 9 para la búsqueda de la mutación

K285N se realizó de acuerdo a las siguientes condiciones: Ciclo 1: desnaturalización a 95°C por 5 minutos, alineamiento a 60°C por 40 segundos, extensión a 72°C por 1 minuto. De los ciclos 2 a 40: 95°C por 1 minuto, 60°C por 40 segundos, 72°C por 1 minuto. Ciclo 41: 95°C por 1 minuto, 60°C por 40 segundos y 72°C por 10 minutos.

En los productos de PCR la digestión se realizó con endonucleasas de restricción para generar fragmentos de distinta longitud (Tabla 2); en la mutación Q188R la transición de A→G en el exón 6 en el codón 188 introduce un nuevo sitio de corte *Hpa*II, el cual es utilizado para determinar este genotipo en la población de estudio. La transversión de AAC>AAT en la mutación K285N crea un sitio de restricción adicional para la endonucleasa *Tsp*509I. En la mutación N314D la transición A→G introduce un nuevo sitio de corte para la endonucleasa *Av*alI. De las enzimas *Hpa*II y *Av*alI se utilizaron 2.5 U (para volúmenes totales de 15 µl) y la restricción se llevó a cabo a 37°C durante 24 horas; para determinar la mutación K285N, los productos de PCR fueron digeridos con 3 U de *Tsp*509I (para volúmenes totales de 15 µl) a 65°C por 12 horas<sup>60</sup>. Los productos de la restricción se visualizaron por electroforesis (U=100V, I=60mA, por 60 minutos) en gel de agarosa al 4%.

**TABLA 2**

MUTACIÓN	EXON	ENZIMA	SITIO DE CORTE	ALELO	PRODUCTOS
				NORMAL	ALELO MUTADO
Q188R	6	<i>Hpa</i> II	5'...C▼CGG...3' 3'...GGC▲C...5'	255 pb	36 pb / 219 pb
K285N	9	<i>Tsp</i> 509I	5'...▼AATT...3' 3'...TTAA▲...5'	716 pb	98 pb / 618 pb
N314D	10	<i>Av</i> alI	5'...G▼GWCC...3' 3'...CCWG▲G...5'	171 pb	82 pb / 89 pb

Para la mutación S135L se realizó la técnica de amplificación por PCR alelo-específica utilizando el siguiente juego de primers:

<b>ALELO</b>	<b>PRIMER F</b>	<b>PRIMER R</b>
<b>S135L</b>	5'TCATGTGCTTCCACCC CTGTTC3'	5'GGAAGGGGCGACCTCACA AAC3'
<b>SILVESTRE</b>	5'TCATGTGCTTCCACCC CTGTTT3'	5'GGAAGGGGCGACCTCACA AAC3'

Dichos primers se utilizaron para amplificar selectivamente el alelo mutado o bien, el alelo silvestre; por lo tanto, se realizaron dos reacciones por separado siguiendo las siguientes condiciones: Ciclo 1: desnaturalización a 95°C por 5 minutos, alineamiento a 65°C por 40 minutos, extensión a 72°C por 1 minuto. Ciclos 2 a 34: 95°C por 40 segundos, 65°C por 40 segundos, 72°C por 1 minuto. Ciclo 35: 95°C por 40 segundos, 65°C por 40 segundos, 72°C por 10 minutos. Los productos de las 2 reacciones se visualizaron por electroforesis en gel de agarosa al 4%.

c) Detección de portadores y asesoramiento genético:

Se brindó asesoramiento genético a las familias captadas de acuerdo a los genotipos observados (familias con ambos alelos caracterizados, familias con al menos un alelo *GALT* caracterizado o sin mutación identificada).

## **ANÁLISIS ESTADÍSTICO.**

El análisis estadístico se realizó utilizando la base de datos generada a partir de las hojas de captación de datos por medio de estadística descriptiva. Los resultados se presentan por promedio y la frecuencia de las mutaciones se reporta en porcentajes.

## **CONSIDERACIONES ÉTICAS.**

El presente trabajo fue aprobado por los comités de Investigación y Ética del Instituto Nacional de Pediatría, además, se solicitó el consentimiento informado de los padres de los casos índice que cumplieron con los criterios de inclusión, para la obtención de 3-5 mL de sangre venosa periférica, raspado de mucosa oral o sangre en papel filtro, extracción de DNA y su posterior análisis, lo que representó un riesgo mínimo para el paciente.

Se pidió al padre o tutor del paciente que firmara la carta de consentimiento informado de él y del paciente. La información personal, de identidad y del genotipo se manejó en forma estrictamente confidencial, siguiendo las normas establecidas por la declaración de Helsinki, las Buenas Prácticas Médicas y del ELSI (del inglés "Ethical, Legal and Social Issues"). El asesoramiento genético se brindó en todos los casos de acuerdo a los resultados obtenidos del estudio molecular.

## RESULTADOS.

Se estudiaron 18 familias en las que existía por lo menos un afectado con diagnóstico confirmado de galactosemia clásica. El 78% de las familias presentaron casos únicos (n=14), mientras que en el 22% restante se presentaron 2 pacientes afectados por familia (n=4). En el 21% de familias con casos únicos (n=3), así como en todos los casos familiares se identificó el antecedente de endogamia o consanguinidad. En 3 de los casos familiares los probandos contaban con un hermano(a) finado(a) por complicaciones atribuibles a una galactosemia clásica.

La edad promedio de los pacientes al momento del estudio fue de 2 años y la proporción de pacientes de sexo femenino y masculino fue de 56% y 44%, respectivamente.

Seis familias proceden del Distrito Federal, 2 de Yucatán, 3 de Guanajuato, 2 del Estado de México, 2 de Michoacán, 1 de Jalisco, 1 de Guerrero y 1 de Colima.

Cinco de los 18 casos índice (27.7%), cuya edad promedio fue de 7 años, resultaron homocigotos para la mutación Q188R. Todos estos pacientes carecen de actividad enzimática de GALT y presentaron galactosa total en sangre >50 mg/dL (valor de referencia: <14mg/dL), galactosuria severa y prueba de Beutler positiva para galactosemia al momento del diagnóstico (periodo neonatal) y 2 pacientes durante el tiempo de exposición alimentaria a la galactosa ( $\pm$ 12 meses); todos presentaron hepatomegalia, ictericia y tubulopatía de grado variable, acompañado de rechazo al alimento y vómito. Neurológicamente todos los pacientes de este grupo presentaron hipotonía y letargia durante el periodo agudo

de intoxicación con galactosa y 2 (40%) persistieron con retraso psicomotor de leve a moderado a pesar de la restricción dietética de galactosa posterior al diagnóstico; en uno de estos pacientes (5.5%) se diagnosticó catarata congénita después del primer año de vida.

Tres casos (16.6%) fueron heterocigotos compuestos, ya que se identificó la mutación Q188R en un alelo y en el otro no se caracterizó la mutación. Dos pacientes presentaron actividad de GALT disminuida y ausencia de sintomatología; ambos fueron diagnosticados por anomalías en el tamiz neonatal como galactosuria moderada, galactosa total en sangre >14 mg/dL y prueba de Beutler con fluorescencia deficiente. El tercer paciente fue diagnosticado a los 5 días de vida al presentar un cuadro severo de hepatomegalia, coagulopatía, vómito e ictericia; a nivel bioquímico presentó galactosa total en sangre >50mg/dL y ausencia de actividad enzimática. El manejo de todos estos pacientes fue restricción dietética absoluta de galactosa.

Dos pacientes (11%) fueron heterocigotos compuestos Q188R/N314D y ninguno de ellos presentó datos clínicos; el motivo de su ingreso al INP fue el hallazgo por tamiz neonatal de actividad enzimática disminuida y galactosa total en sangre >14 mg/dL.

Se observaron 2 pacientes (11%) homocigotos para la mutación N314D. Uno fue diagnosticado por anomalías en el tamiz neonatal y actividad enzimática deficiente, mientras que en el segundo se evidenció catarata congénita y actividad enzimática casi ausente; sorpresivamente en el análisis molecular familiar de este paciente, sólo el padre es portador de la mutación N314D y en la

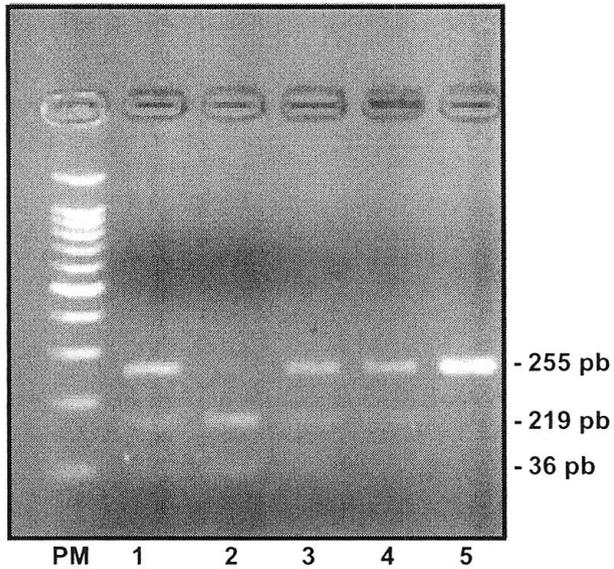
madre no se identificó ningún cambio (fig. 8); a ambos padres se les realizó prueba de Beutler, confirmando actividad enzimática normal.

En 2 pacientes (11%) sólo se identificó la mutación N314D en un alelo. Ambos presentan actividad enzimática disminuida y uno de ellos desarrolló catarata congénita incipiente.

En un paciente de 1 año de edad, con ausencia total de actividad enzimática, galactosa total >50 mg/dL, hepatopatía y retraso psicomotor se identificó en ambos alelos la mutación S135L.

En ninguno de los casos analizados se identificó el cambio K285N y en 3 pacientes (16.6%) no fue posible identificar las mutaciones responsables.

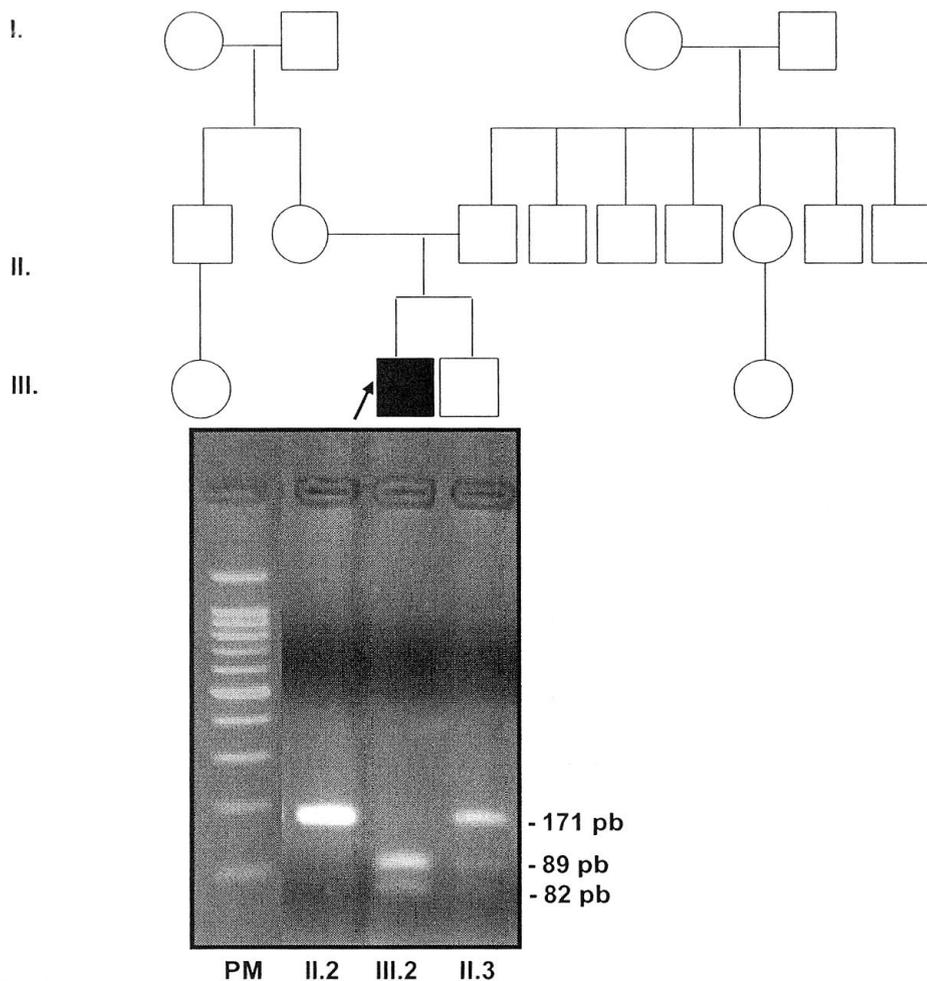
Todos los pacientes fueron evaluados clínicamente a distintos intervalos de tiempo de acuerdo a su edad; durante el primer año de vida se les dio seguimiento cada 3 meses para adecuar la dieta en base a la ablactación y ganancia de peso. A mayores de un año de edad se les citó cada 6 meses para registrar su desarrollo y crecimiento. El apego a la dieta libre de galactosa fue total en todos los casos, sin embargo, en los pacientes en edad escolar, los padres no pudieron garantizar la restricción absoluta de galactosa de los alimentos ingeridos en la escuela.



**FIGURA 7**

**ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA AL 4% PARA ANÁLISIS DE LA MUTACIÓN Q188R.**

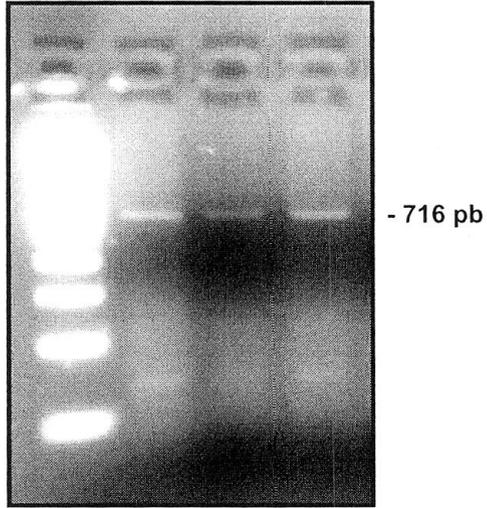
Carriles 1, 3 y 4: Heterocigotos para la mutación, se observan tanto el alelo silvestre como los productos de corte del alelo mutado. Carril 2: Homocigoto para la mutación, sólo se observan los productos de corte del alelo mutado. Carril 5: Alelo silvestre de 255 pb.



**FIGURA 8**

**ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA AL 4% PARA ANÁLISIS DE LA MUTACIÓN N314D.**

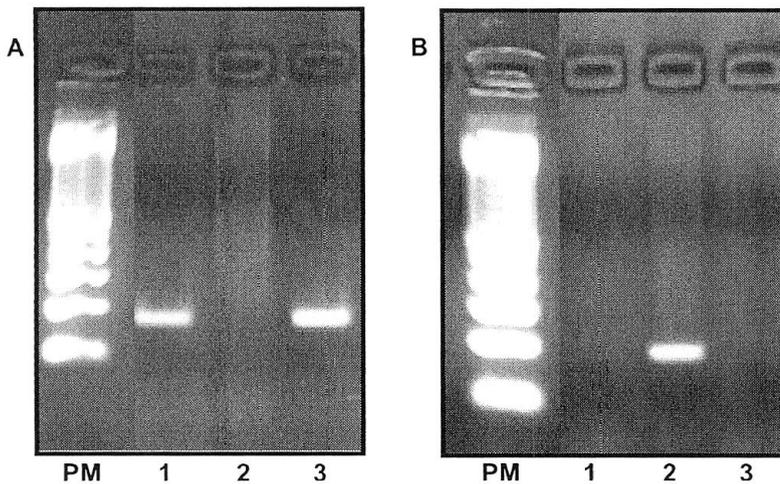
Carril II.2: en la madre del caso índice se observa una sola banda de 171 pb que corresponde al alelo silvestre. Carril III.2: alelo mutado con sitio de corte que crea dos productos de 89 y 82 pb que sugiere homocigocidad. Carril II.3: Padre del caso índice, molecularmente se confirma estado de portador heterocigoto en el que se observan tanto el alelo silvestre como el mutado.



**FIGURA 9**

**ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA AL 4% PARA ANÁLISIS DE LA MUTACIÓN K285N.**

En todos los carriles se observa alelo silvestre de 716 pb.



**FIGURA 10A y 10B**

**ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA AL 4% PARA ANÁLISIS DE AMPLIFICACIÓN ALELO-ESPECÍFICA PARA LA MUTACIÓN S135L.**

Carril 2 figura 10A: Ausencia de amplificación del alelo mutado al utilizar oligos con secuencia silvestre. Carril 2 figura 10B: amplificación del alelo mutado utilizando oligos con secuencia mutada.

**TABLA 3****FRECUENCIA DE LOS ALELOS**

<b><i>ALELO</i></b>	<b>%</b>	<b><i>N</i></b>
Q188R	42	15
K285N	0	0
N314D	22	8
S135L	6	2
No identificados	30	11
Total	100	36

**TABLA 4**

**RELACIÓN GENOTIPO-FENOTIPO**

<i>GENOTIPO</i>	<i>NÚMERO PACIENTES</i>	<i>FENOTIPO ENZIMÁTICO</i>
Q188R/Q188R	5	Severo <sup>1</sup>
Q188R/X	3	Moderado <sup>2</sup>
Q188R/N314D	2	Moderado <sup>2</sup>
N314D/N314D	2	Moderado <sup>2</sup>
N314D/X	2	Moderado <sup>2</sup>
S135L/S135L	1	Severo <sup>1</sup>

n total=18 pacientes. En 3 casos no se identificaron las mutaciones responsables.

<sup>1</sup> Ausencia total de GALT.

<sup>2</sup> Valores de GALT 3-18 U/g Hb.

En cuanto a la detección de portadores, se estudiaron a 32 familiares en primer grado: 14 padres, 16 madres y 1 hermanos. En 2 familias no fue posible obtener muestra de DNA de los padres ya que no se contaba con datos para contactarlos. En 2 casos sólo se obtuvo muestra de las madres ya que a los padres no les fue posible asistir a la consulta por que residen en provincia. Se confirmaron 11 portadores heterocigotos para la mutación Q188R (6 madres y 5 padres) y 7 portadores heterocigotos N314D (4 madres y 3 padres). En las 6

madres y 6 padres restantes no se caracterizaron las mutaciones responsables de la galactosemia clásica. Se identificó como homocigoto S135L al hermano de la paciente con dicho genotipo, quien cursó en la etapa neonatal con hepatopatía y actualmente presenta retraso psicomotor y ataxia leves a pesar de la restricción dietética de galactosa, ya que en él se realizó el diagnóstico después de los 6 meses de edad.

## **DISCUSIÓN.**

En el tamiz neonatal realizado en México no se hacen pruebas para la detección de galactosemia. Desafortunadamente, son pocos los neonatos, todos ellos nacidos en el medio hospitalario privado, los que tienen acceso a dicha prueba que se realiza en laboratorios norteamericanos. Esto crea un problema para la mayoría de los enfermos de galactosemia de nuestro país, ya que sólo serán diagnosticados cuando presenten sintomatología hepática, neurológica u oftalmológica, cuyo curso es potencialmente letal y con alta tasa de morbilidad. En el tamiz neonatal que contempla la galactosemia se realiza la determinación cualitativa de GALT y reporta niveles totales de galactosa en sangre cuando estos sobrepasan el límite normal; si el resultado es sugestivo de galactosemia en otros países se realiza la genotipificación de las mutaciones más frecuentes.

Varias de las mutaciones descritas en el gen *GALT* se presentan con mayor frecuencia en algunos grupos étnicos. Las mutaciones más comunes, Q188R, K285N y N314D corresponden al 70% de las mutaciones en población caucásica, mientras que la mutación S135L corresponde hasta al 62% de los alelos causantes de galactosemia clásica en población Afro-Americana.

El cambio Q188R es altamente prevalente en varias poblaciones y no se encuentra en individuos con actividad de GALT conservada. Dicha mutación produce un efecto dramático e inequívoco en la enzima que causa deterioro severo de su función. Estos hallazgos se corroboraron en nuestro estudio al ser el alelo más frecuente en la población de estudio; su prevalencia fue 42% vs 58% reportado en población latina por Wong y cols. La cifra menor que nosotros observamos con relación a la literatura pudiera estar en relación al tamaño reducido de nuestra muestra de estudio. Así mismo, todos los pacientes homocigotos para esta mutación debutaron con elevados niveles de galactosa total en sangre, prueba de Beutler con ausencia de actividad enzimática y glucosuria severa que clínicamente se tradujo en hepatopatía, hipotonía y, en un caso, catarata congénita.

La presentación clínica de los 3 casos heterocigotos Q188R/X fue variable y esto probablemente se encuentra relacionado al fenotipo enzimático que produce la segunda mutación aún no identificada, para la cual en el Laboratorio de Biología Molecular se harán otras estrategias metodológicas para su caracterización.

La frecuencia del alelo N314D fue similar a la observada a nivel mundial (22% de los alelos analizados). Para los 2 casos heterocigotos compuestos Q188R/N314D, la funcionalidad enzimática que proporciona el alelo Duarte evitó la elevación severa de galactosa total en sangre y la aparición de sintomatología hepática y neurológica temprana y grave.

Los portadores de un alelo N314D y otro no identificado mostraron curso clínico variable, también probablemente relacionado a la funcionalidad enzimática condicionada por la segunda mutación aún no caracterizada.

La homocigocidad para el alelo N314D brinda un pronóstico favorable ya que la actividad enzimática residual evita la acumulación de galactosa-1-fosfato, galactosa y galactitol. La catarata congénita observada en un paciente de este grupo representa la excepción a la regla, ya que este genotipo no se asocia con patología ocular y en muchos casos con ausencia total de sintomatología a lo largo de la vida, sin embargo, el encontrar sólo portador de la mutación al padre, sugiere dos posibles escenarios que podrían explicar el fenómeno: disomía uniparental paterna del cromosoma 9 o bien, una mutación tipo deleción en el alelo materno. La primera opción resulta poco viable ya que a la fecha no hay reportes que apoyen la disomía uniparental de la región de *GALT* del cromosoma 9, pero en un futuro se realizarán estudios de marcadores microsatélites en la familia para confirmar o descartar este fenómeno. La segunda teoría se basa en el hecho de que la amplificación de DNA por PCR no ocurriría ante una deleción ya que si uno de los alelos mutados tiene una deleción del gen completo o de sitios críticos para la hibridación de los oligonucleótidos, el alelo no deletado amplificará y dará un resultado falso de homocigocidad para el alelo con la mutación puntual. En este caso también se requiere realizar otras estrategias moleculares para confirmar la deleción materna.

La ausencia del alelo K285N en nuestra población de estudio pudiera ser reflejo del efecto fundador que dicho cambio tiene en población de Europa Oriental y a que la migración de su población originaria está limitada en nuestro país.

La identificación de la mutación S135L en una familia con dos hermanos afectados, confirma que en población mexicana existe contribución genética de origen de raza negra. A pesar de que esta mutación no se describe en población

caucásica, ningún miembro de esta familia presenta fenotipo negroide y ambos padres provienen de una región endogámica del Estado de México, lo que sugiere que dicho cambio ha estado presente en esta comunidad hace varias generaciones.

La frecuencia total de alelos identificados por las metodologías empleadas en este estudio fue de 70%. Dada la gran heterogeneidad alélica que presenta la galactosemia, los alelos no identificados deberán genotipificarse por otras metodologías como SSCP, lo que también permitirá conocer si existen mutaciones propias de población mexicana.

## **CONCLUSIONES.**

Los mejores predictores del pronóstico de los pacientes afectados por la galactosemia clásica son los parámetros bioquímicos, enzimáticos y el genotipo de *GALT*. Aunado al seguimiento clínico estrecho de los pacientes, gracias a estos resultados se pueden ofrecer intervenciones para evitar o disminuir las secuelas ocasionadas por la acumulación de galactosa y galactitol a distintos niveles.

Este estudio enfatiza la necesidad del tamizaje bioquímico y genético para galactosemia clásica en población mexicana con el fin de captar los casos sospechosos, confirmar los casos positivos y así prevenir complicaciones, retraso mental o la muerte en los pacientes afectados por la enfermedad al instaurar un tratamiento oportuno.

La historia familiar, el fenotipo bioquímico y el genotipo molecular de los pacientes afectados por galactosemia clásica permiten un diagnóstico sensible y específico de la patología. Además, del asesoramiento genético de certeza se pueden

identificar a otros familiares en riesgo de ser portadores de mutaciones de *GALT*, e incluso ofrecerles diagnóstico prenatal.

En el futuro, nos permitirá realizar la búsqueda de cambios en *GALT* responsables de galactosemia clásica en otro grupo de padecimientos, como aquellos con defectos de canalización genital, infertilidad femenina o catarata presenil aislada, en los cuales la literatura ha demostrado que un porcentaje de ellos son causados por mutaciones heterocigotas de *GALT*.

## ANEXO 1

### CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO (menores de edad)

México, D. F., a \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 200\_

Por medio de la presente hago constar que estoy de acuerdo en que yo y mi hijo(a) \_\_\_\_\_ participemos en el proyecto **“DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE LAS MUTACIONES Q188R, K285N Y N314D EN PACIENTES CON GALACTOSEMIA CLÁSICA”**, que se lleva a cabo en el Instituto Nacional de Pediatría. Se me ha explicado que para la realización del estudio, se requiere una muestra de sangre periférica, la cual será tomada con todos los requisitos de seguridad por lo que no representa ningún riesgo para ninguno de nosotros. Además, me han informado que de la muestra de sangre se obtendrá el material genético, cuyo análisis permitirá identificar las mutaciones que se asocian con la galactosemia y es probable que en un futuro los resultados puedan servir para un mejor diagnóstico, pronóstico y tratamiento de esta patología.

Así mismo, se me ha indicado que toda información derivada del estudio es absolutamente confidencial y que nuestra participación es completamente voluntaria, por lo que si no deseamos participar, ello no repercutirá en la atención de mi hijo (a).

Atentamente,

\_\_\_\_\_  
Padre, Madre o tutor

\_\_\_\_\_  
Testigo

Médico responsable: Dra. Ariadna González del Ángel.

## ANEXO 1.1

### CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO (mayores de edad)

México, D. F., a \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 200\_

Por medio de la presente hago constar que yo, \_\_\_\_\_, estoy de acuerdo en participar en el estudio **“DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE LAS MUTACIONES Q188R, K285N Y N314D EN PACIENTES CON GALACTOSEMIA CLÁSICA”**, que se lleva a cabo en el Instituto Nacional de Pediatría. Se me ha explicado que para la realización del estudio, se requiere una muestra de sangre periférica, la cual será tomada con todos los requisitos de seguridad por lo que no representa ningún riesgo para ninguno de nosotros. Además, me han informado que de la muestra de sangre se obtendrá el material genético, cuyo análisis permitirá identificar las mutaciones que se asocian con la galactosemia y es probable que en un futuro los resultados puedan servir para un mejor diagnóstico, pronóstico y tratamiento de esta patología.

Así mismo, se me ha indicado que toda información derivada del estudio es absolutamente confidencial y que mi participación es completamente voluntaria, por lo que si no deseo participar, ello no repercutirá en mi atención médica.

Atentamente,

\_\_\_\_\_  
Padre o Madre

\_\_\_\_\_  
Testigo

Médico responsable: Dra. Ariadna González del Ángel.

## **ANEXO 2**

### **DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE LAS MUTACIONES Q188R, K285N Y N314D EN PACIENTES CON GALACTOSEMIA CLÁSICA**

Caso índice: \_\_\_\_\_

Sexo: M \_\_\_ F \_\_\_ Edad: \_\_\_\_\_ (años)

Institución tratante: \_\_\_\_\_

Expediente No. \_\_\_\_\_ Fecha de nacimiento: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_

No. Registro interno (muestra DNA): \_\_\_\_\_

Consanguinidad: \_\_\_\_\_

Lugar de Origen: \_\_\_\_\_

Árbol Genealógico

Las manifestaciones por aparatos y sistemas enunciadas a continuación se definieron en el marco teórico.

1 Si = Presente

2 No = Ausente

### I. OFTALMOLÓGICO

Catarata congénita

### III. HEPÁTICO

Hepatomegalia

### IV. RENAL

Tubulopatía

### VI. HEMATOLÓGICO

Coagulopatía

### VIII. NEUROLÓGICO

Letargia

Hipotonía

Retraso psicomotor/mental

Ataxia

### II. GASTROINTESTINAL

Rechazo al alimento

Vómito

Diarrea

### V. PIEL Y MUCOSAS

Ictericia

### VII. INMUNOLÓGICO

Infección E. coli, gram (-)

### IX. LABORATORIO

Prueba de Beutler (+)

Galactosuria

Determinación GALT

Galactosa total en sangre

Valor: \_\_\_\_\_

## REFERENCIAS

---

- <sup>1</sup> Goppert, F. Galaktosurie nach Milchzuckergabe bei angeborenem, familiaerem chronischem Leberleiden. *Klin. Wschr* 1917; 54: 473-477.
- <sup>2</sup> Walter JH, Collins JE, Leonard JV, et al. Recommendations for the management of galactosaemia. *Arch Dis Child* 1999; 80: 93-96.
- <sup>3</sup> Kalckar HM, Anderson EP, Isselbacher KJ. Galactosemia, a congenital defect in a nucleotide transferase: a preliminary report. *Proc Nat Acad Sci USA* 1956; 42: 49-51.
- <sup>4</sup> Waggoner DD, Biest NRM, Donnell G. Long term prognosis in galactosemia: results of a survey of 350 cases. *J Inherit Metab Dis* 1990; 13: 802-818.
- <sup>5</sup> Flach J, Reichardt L, Elsas L. Sequence of a cDNA encoding human galactose-1-phosphate uridylyltransferase. *Mol Biol Med* 1990; 7: 365-369.
- <sup>6</sup> Doménech E, Castro R, Fuster P, et al. Trastornos congénitos del metabolismo de la galactosa. *Monografías de Pediatría* 1990; 63: 26-35.
- <sup>7</sup> Gray JM. Carbohydrate digestion and absorption: role of the small intestine. *N Eng J Med* 1975; 292: 1225.
- <sup>8</sup> Stenstam T. Peroral and intravenous galactose tests: comparative study of their significance in different conditions. *Acta Med Scand* 1946; 177: 1.
- <sup>9</sup> Bunn BH, Higgins PJ. Reaction of monosaccharides with protein: possible evolutionary significance. *Science* 1981; 213: 222.
- <sup>10</sup> Holden MH, Rayment I, Thoden JB. Structure and function of enzymes of the Leloir pathway for galactose metabolism. *J Bio Chem* 2003; 278: 43885-43888.
- <sup>11</sup> Elsevier JP, Wells L, Quimby BB, et al. Heterodimer formation and activity in the human galactose-1-phosphate uridylyltransferase. *Proc Nat Acad Sci USA* 1996; 93: 7166-7171.
- <sup>12</sup> Henderson JM, Wells L, Fridovich-Keil JL. Covalent heterogeneity of the human enzyme galactose-1-phosphate uridylyltransferase. *J Biol Chem* 2000; 275: 30088-30091.
- <sup>13</sup> Hester LS, Raushel FM. Analysis of ping-pong reaction mechanisms by positional isotope exchange: application to galactose-1-phosphate uridylyltransferase. *J Bio Chem* 1987; 262: 12092-12095.

- 
- <sup>14</sup> Pesce MA, Bodourian SH. Clinical significance of plasma galactose and erythrocyte galactose-1-phosphate measurements in transferase-deficient galactosemia and in individuals with below-normal transferase activity. *Clin Chem* 1982; 28: 301-305.
- <sup>15</sup> Gitzelmann R, Bosshard NU. Partial deficiency of galactose-1-phosphate uridyltransferase. *Eu J Pediatr* 1995; 154: S40.
- <sup>16</sup> Holton JB, Walter HG, Tayfield LA. Galactosemia. En Scriver CR, Beaudet AL, Sly W, Valle D, eds; Child B, Kinzler KW, Vogelstein B, assoc eds. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Diseases*. 8<sup>th</sup> edn. New York 2001; McGraw-Hill, 1553-1587.
- <sup>17</sup> Schadewalt P, Killius S, Kamalanathan L, et al. Renal excretion of galactose and galactitol in patients with classical galactosaemia, obligate heterozygous parents and healthy subjects. *J Inherit Metabol Dis* 2003; 26: 459-479.
- <sup>18</sup> Shin-Buehring YS, Beber T, Tan A, et al. The activity of galactose-1-phosphate uridyltransferase and galactokinase in human fetal organs. *Pediatr Res* 1977; 11: 1045.
- <sup>19</sup> Vázquez-López ME, Martínez-Regueira S, Somoza-Rubio C, et al. Hipotonía y letargia: manifestaciones iniciales de un nuevo caso de galactosemia. *Rev Neurol* 2004; 39: 240-242.
- <sup>20</sup> Litchfield WJ, Wells WW. Effects of galactose on free radical reactions of polymorphonuclear leucocytes. *Arch Biochem Biophys* 1978; 188: 26-30.
- <sup>21</sup> Ridel KR, Leslie ND, Gilbert DL. An updated review of the long term neurological effects of galactosemia. *Pediatric Neurology* 2005; 33: 153-161.
- <sup>22</sup> Nelson MD, Wolf JA, Cross CA, et al. Galactosemia: evaluation with MR imaging. *Radiology* 1992; 184: 255-261.
- <sup>23</sup> Beutler E, Baluda MC. A simple spot screening test in galactosemia. *J Lab Clin Med* 1966; 68: 137.
- <sup>24</sup> Clayton PE. Recommendations for the management of galactosemia. *Arch Dis Child* 2000; 82: 336-337.
- <sup>25</sup> Holton JB, Leonard JV. Clouds still gathering over galactosemia. *Lancet* 1994; 334: 1242-1243.

- 
- <sup>26</sup> Acosta PB, Gross KC. Hidden sources of galactose in the environment. *Eur J Pediatr* 1995; 154: S87.
- <sup>27</sup> Berry GT, Nissim I, Lin Z, et al. Endogenous synthesis of galactose in normal men and in patients with hereditary galactosemia. *Lancet* 1995; 346: 1073-4.
- <sup>28</sup> Berry TG, Moate PJ, Reynolds RA, et al. The rate of the novo galactose synthesis in patients with galactose-1-phosphate uridylyltransferase deficiency. *Mol Genet Metabol* 2004; 81: 22-30.
- <sup>29</sup> Kaufman FR, Loro ML, Azen C, et al. Effect of hypogonadism and deficient calcium intake on bone density in patients with galactosemia. *J Pediatr* 1993; 123: 365-370.
- <sup>30</sup> Sparkes RS, Sparkes MC, Funderburck SJ, et al. Expression of GALT in 9p chromosome alterations: assignment of GALT locus to 9cen→9p22. *Ann Hum Genet* 1980; 43: 343-347.
- <sup>31</sup> Leslie ND, Immerman EB, Flach JE, et al. The human galactose-1-phosphate-uridylyltransferase gene. *Genomics* 1992; 14: 474-80.
- <sup>32</sup> Magrangeas F, Pitiot G, Dubois S, et al. Cotranscription and intergenic splicing of human galactose-1-phosphate uridylyltransferase and interleukin-11 receptor  $\alpha$ -chain genes generate a fusion mRNA in normal cells. *J Biol Chem* 1998; 273: 16005-16010.
- <sup>33</sup> Wedekind JE, Frey PA, Rayment I. *Biochemistry* 1995; 34: 11049-11061.
- <sup>34</sup> Elsas LJ, Dembure PP, Langley S, et al. A common mutation associated with the Duarte galactosemia allele. *Am J Hum Genet* 1994; 54: 1030-1036.
- <sup>35</sup> <http://www.ich.bris.ac.uk/galtdb>
- <sup>36</sup> <http://www.emory.edu/PEDIATRICS/medgen/research/db.htm>
- <sup>37</sup> Ng WG, Xu YK, Kaufmann FR, et al. Biochemical and molecular studies of 132 patients with galactosemia. *Hum Genet* 1994; 94: 359.
- <sup>38</sup> Wong LJ, Xu YK, Wanr BT, et al. Genotyping of 277 galactosemia patients. *Am J Human Genet* 1996; 59 (suppl): A295 (resumen).

- 
- <sup>39</sup> Christacos NC, Fridovich-Keil JL. Impacto of patient mutations on heterodimer formation and function in human galactose-1-P-uridytransferase. *Mol Gen Metab* 2002; 76: 319-326.
- <sup>40</sup> Zekanowsky C, Radomyska B, Bal J. Molecular characterization of Polish patients with classical galactosemia. *J Inher Metabol Dis* 1999; 22: 679.
- <sup>41</sup> Elsas LJ, Lai K, Saunders CJ, et al. Functional analysis of the human galactose-1-phosphate uridytransferase promoter in Duarte and LA variant galactosemia. *Mol Gen Metabol* 2001; 72: 297-305.
- <sup>42</sup> Beutler E, Baluda ML, Sturgeon P, et al. A new genetic abnormality resulting in galactose-1-phosphate uridytransferase deficiency. *Lancet* 1965; 1: 353-55.
- <sup>43</sup> Ng W, Bergren W, Donnell G. A new variation of galactose-1-phosphate uridytransferase in ma: the Los Angeles variant. *Am J Hum Genet* 1972; 37: 1-8.
- <sup>44</sup> Reichardt J, Woo S. Molecular characterization of two galactosemia mutations: correlation of mutations with highly conserved domains in galactose-1-phosphate uridytransferase. *Am J Hum Genet* 1991; 49: 860-867.
- <sup>45</sup> Fridovich-Keil J, Booth-Quimby B, Wells L, et al. Characterization of the N314D allele in human galactose-1-phosphate uridytransferase using a yeast expression system. *Biochem Mol Med* 1995a; 56: 121-130.
- <sup>46</sup> Lin H, Reichardt J. Linkage disequilibrium between Sac I restriction fragment length polymorphism and two galactosemia mutations. *Hum Genet* 1995; 95: 353-355.
- <sup>47</sup> Gathof B, Sommer M, Podskarbi R, et al. Characterization of two stop codon mutations in the galactose-1-phosphate uridytransferase gene of three male galactosemic patients with severe clinical manifestation. *Hum Genet* 1995; 96: 721-725.
- <sup>48</sup> Lai K, Elsas LJ. Structure-function analyses of a common mutation in blacks with transferase-deficiency galactosemia. *Mol Genet Metabol* 2001; 74: 264-272.
- <sup>49</sup> Elsas JL, Lai K. The molecular biology of galactosemia. *Gen in Med* 1998; 1: 40-48.
- <sup>50</sup> [www.hgmd.cf.ac.uk/ac/maps/119971.gif](http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/maps/119971.gif)

- 
- <sup>51</sup> Podskarbi T, Bieger W, Shin Y. Allelic heterogeneity of the galactose-1-phosphate uridyltransferase gene: biochemical and clinical phenotypes. *Eur J Clin Chem Biochem* 1997; 35: A27.
- <sup>52</sup> Ichiba Y. The variant of galactosemia. *Jpn Pediatr* 1989; 42: 579-582.
- <sup>53</sup> Greenage S, Frey P. Transient kinetics of formation and reaction of the uridyl-enzyme from galactose-1-phosphate uridyltransferase and its Q188R variant: insight into the molecular biology of galactosemia. *Biochemistry* 1998; 37: 14500-14507.
- <sup>54</sup> Dobrowolsky SF, Banas RA, Suzow JG, et al. Analysis of common mutations in the galactose-1-phosphate uridyltransferase gene: new assays to increase the sensitivity and specificity of newborn screening for galactosemia *J Mol Diag* 2003; 5: 42-47.
- <sup>55</sup> Tyfield L, Reichardt J, Fridovich-Keil J, et al. Classical galactosemia and mutations at the galactose-1-phosphate uridyltransferase (GALT) gene. *Hum Mutat* 1999; 13: 417-430.
- <sup>56</sup> Cramer DW, Goldstein DP, Fraer D, et al. Vaginal agenesis (Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser Syndrome) associated with the N314D mutation in galactose-1-phosphate uridyltransferase (GALT). *Mol Hum Reprod* 1996a; 2: 145-148.
- <sup>57</sup> Lai K, Elsas JL. Structure-function analyses of a common mutation in blacks with transferase-deficiency galactosemia. *Mol Genet Metabol* 2001; 74: 264-272.
- <sup>58</sup> Wang BBT, Xu Y, Ng WG, et al. Molecular and biochemical basis of galactosemia. *Mol Gen Metabol* 1998; 63: 263-269.
- <sup>59</sup> Elsas LJ, Fridovich-Keil JL, Leslie ND. Galactosemia: a molecular approach to the enigma. *Int Pediatr* 1993; 8: 101.
- <sup>60</sup> Kauffman FR, Reichardt JK, Ng WG. Correlation of cognitive, neurologic and ovarian outcome with the Q188R mutation of the galactose-1-phosphate uridyltransferase gene. *J Pediatr* 1994; 125: 225.
- <sup>61</sup> Novelli Giuseppe, Reichardt JK. Molecular basis of disorders of human galactose metabolism: past, present and future. *Mol Gen Metabol* 2000; 71: 62-65.
- <sup>62</sup> Martins E, Texeira J, Cardoso ML, et al. Galactosemia: genotipo y fenotipo de siete pacientes. *Rev Neurol* 2004; 38: 1132-1135.

---

<sup>63</sup> Karas N, Gobec L, Pfeifer V, et al. Mutations in galactose-1-phosphate uridylyltransferase gene in patients with idiopathic presenile cataract. *J Inherit Metab Dis* 2003; 26: 699-704.

<sup>64</sup> Lo W, Packman S, Nash S, et al. Curious neurologic sequelae in galactosemia. *Pediatrics* 1984; 73: 309-12.

<sup>65</sup> Webb AL, Singh RH, Kennedy MJ, et al. Verbal dysplaxia and galactosemia. *Pediatr Res* 2003; 53: 396-402.

<sup>66</sup> Schweitzer S, Shin Y, Jakobs C, et al. Long-term outcome in 134 patients with galactosemia. *Eur J Pediatr* 1993; 152: 36-43.

<sup>67</sup> Guerrero NV, Singh RH, Manatunga A, et al. Risk factors for premature ovarian failure in females with galactosemia. *J Pediatr* 2000; 137: 833-41.