

# Análisis molecular de la delección de 5.5kb en el gen GALT en pacientes con galactosemia.

Tutores: Dra. Ariadna Estela González del Ángel  
M en C. José Antonio Velázquez Aragón

Coautores: Dra. Marcela Vela Amieva  
Dr. Miguel Ángel Alcántara Ortigoza  
Dra. Susana Monroy Santoyo

Tesista: Dra. Nadine Frank Márquez



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mis papás, gracias por tantos y tantos años de apoyo, a Ilana y Sabi por hacerme la vida más feliz.

Alex, el amor lo puede todo.

A todos los amigos que saben lo que esto significa, gracias por las porras.

Al laboratorio de Biología Molecular del INP, especialmente a la salvación, la Dra. Ariadna, y a José, al Dr. Miguel, la Dra. Vela, y la Dra. Monroy, muchas gracias.

Al INP y a todos sus pacientes y papas, gracias por enseñarme como funciona la vida, y darme herramientas para mejorarle el día a los niños mexicanos.

Muchas gracias a todas las personas que me ayudaron a ver que cada día es único, y nada es tan grave.

## INDICE

I.	MARCO TEORICO	2
II.	JUSTIFICACION	9
III.	OBJETIVO	10
IV.	MATERIAL Y METODOS	11
V.	ANALISIS ESTADISTICO	13
VI.	CONSIDERACIONES ETICAS	13
VII.	RESULTADOS	14
VIII.	DISCUSION	20
IX.	CONCLUSIONES	24
X.	APENDICES	25
XI.	BIBLIOGRAFIA	29

## **I. MARCO TEÓRICO**

### **Definición**

La galactosemia es un error innato en el metabolismo de la galactosa por deficiencia de la enzima galactosa-1-fosfato uridiltransferasa (Bosch 2006).

### **Aspectos históricos**

La galactosemia clásica fue descrita por primera vez por von Reuss en 1908. A mediados de los años 1950s, Komrower demostró un acúmulo de galactosa 1 fosfato en eritrocitos, definiendo enzimáticamente la enfermedad como la deficiencia de galactosa 1 fosfato uridiltransferasa (*GALT*). Mason y Turner demostraron que el restringir la galactosa de la dieta podía aliviar los síntomas agudos neonatales (Ridel 2005).

En 1960 se desarrolló un estudio enzimático por Beutler utilizado como tamizaje, al medir la actividad enzimática de *GALT* en una gota de sangre depositada en papel filtro (Ridel 2005).

### **Epidemiología**

La incidencia estimada es de 2 casos por cada 100,000 recién nacidos vivos. Sin manejo la mortalidad neonatal en pacientes con galactosemia puede ser hasta en el 20% de los casos (Doménech 1990).

### **Fisiopatología**

La galactosa ingerida se metaboliza rápidamente a glucosa-1-fosfato en la mayoría de los organismos, por la acción de cuatro enzimas que constituyen la vía metabólica Leloir. En el primer paso, la  $\beta$ -D-galactosa se epimeriza a  $\alpha$ -D-galactosa mediante la galactosa mutarotasa (*GALM*). El segundo paso implica la fosforilación dependiente de ATP de la  $\alpha$ -D-galactosa por la galactocinasa (*GALK*), a galactosa 1-fosfato (*GALK*). En el siguiente paso, la galactosa-1-fosfato-uridiltransferasa (*GALT*) cataliza la transferencia de un grupo uridil-monofosfato a la galactosa-1-fosfato generando glucosa-1-fosfato y uridil-fosfato-galactosa. El último paso consiste en la interconversión de UDP-galactosa a UDP-glucosa por la UDP-galactosa 4-epimerasa (*GALE*). Por lo tanto, en los humanos los defectos en los genes que codifican para cada una de las tres últimas enzimas pueden ocasionar la enfermedad conocida como galactosemia. De éstas, la deficiencia de *GALT* es la más prevalente y se conoce como galactosemia clásica (Bosch 2006).

### **Cuadro clínico**

La galactosemia clásica se presenta como una enfermedad mortal en las primeras semanas de vida posterior a la ingesta de galactosa, predominantemente derivada de la lactosa. Los primeros síntomas clínicos son: dificultad para la alimentación, vómito, diarrea, letargia, e hipotonía. A la exploración física se encuentra ictericia, catarata congénita, hepatomegalia y equimosis secundarias a alteraciones en la coagulación.

La disfunción hepática suele comenzar con cambios inflamatorios o infiltración grasa del hígado, para evolucionar hacia cirrosis (Bosch 2006).

En los estudios paraclínicos se encuentra alteración en la función hepática con hiperbilirrubinemia conjugada y no conjugada, elevación de transaminasas, elevación de aminoácidos, alteraciones en la coagulación, hipoglucemia. Además se puede observar disfunción tubular renal con acidosis metabólica, galactosuria, glucosuria, fosfaturia, hipofosfatemia, aminoaciduria y albuminuria. Otros hallazgos son alteraciones hematológicas como anemia hemolítica (Bosch 2006).

Durante la primera semana de vida, es frecuente que los neonatos con la forma aguda de galactosemia tengan infección por *Escherichia coli* u otros bacilos gram negativos (Bosch 2006). Esa susceptibilidad a infecciones se relaciona con una disminución en la actividad fagocitaria y bactericida leucocitaria (Litchfield 1978).

Se ha propuesto que la acumulación de galactitol es responsable de la mayoría de los efectos tóxicos sistémicos y del deterioro neurológico (Ridel 2005). La síntesis anormal de glucolípidos también contribuye a la alteración de la función cerebral (Bosch 2006).

Estudios de imagen con resonancia magnética nuclear han demostrado disminución de la sustancia blanca como resultado de una mielinización deficiente producida por la alteración primaria de la estructura de la mielina (Nelson 1992).

## **Diagnóstico**

La prueba de Beutler es un estudio cualitativo que determina la presencia de la actividad de *GALT*; es utilizada para realizar el diagnóstico neonatal de galactosemia clásica. Pueden ocurrir falsos negativos cuando el paciente ha sido transfundido durante los tres últimos meses, así como en pacientes con deficiencia de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (Beutler 1966).

El estándar de oro en el diagnóstico es la medición de actividad de galactosa 1 fosfato uridiltransferasa en eritrocitos (Bosch 2006). Las concentraciones de galactosa-1-fosfato siempre se encuentran elevadas en pacientes con galactosemia clásica y no se ven significativamente alteradas por transfusiones sanguíneas (Holton 1994). Se debe tener en cuenta que cada laboratorio cuenta con sus propios rangos y límites y en este estudio se tomaron los siguientes rangos con relación a la actividad enzimática de *GALT*:

- Normal >18 u/gHb
- Deficiencia Moderada 3-18 u/gHb
- Deficiencia Severa 0-3 u/gHb

El diagnóstico de galactosemia se debe considerar cuando se observan concentraciones elevadas de galactosa total en sangre. En este estudio se tomó el valor de galactosa total en sangre mayor a 14 mg/dL como alterado (New England Newborn Screening Program (NENSP)).

Cuando se obtienen resultados positivos para esta enfermedad por medio de la prueba de tamiz metabólico, algunos de estos casos son falsos positivos (Doménech 1990) ya que son individuos heterocigotos compuestos (G/D) es decir tienen un genotipo con una mutación que condiciona galactosemia (alelo G) y en el otro alelo portan la variante o polimorfismo Duarte (D), lo que les condiciona una deficiencia parcial de la enzima *GALT*, en estos casos los niveles enzimáticos se elevan en el primer año de vida y generalmente no requieren manejo por lo que no se consideran pacientes con galactosemia (Ridel y Leslie 2005). Estos datos evidencian la necesidad de conocer el genotipo de todos los casos que por tamiz metabólico se observan con niveles de *GALT* bajos para distinguir los pacientes con Galactosemia que requieren manejo ya que portan sus dos alelos mutados (G/G) de los falsos positivos que se dan por ser heterocigotos compuestos (G/D) que no requieren tratamiento. (Gitzelmann 1995).

### **Complicaciones**

La presencia de complicaciones a largo plazo depende de la edad al diagnóstico, siendo más prevalentes en pacientes mayores de dos meses de edad al momento del diagnóstico (Bosch 2006). Entre las complicaciones más frecuentes se encuentran las alteraciones en el desarrollo neurológico y motor, las alteraciones endocrinológicas, y la presencia de patología oftálmica.

En pacientes con galactosemia clásica se ha descrito la presencia de enfermedad neurológica progresiva. Se ha reportado un coeficiente intelectual menor al del promedio de la población, con disminución del mismo conforme aumenta la edad (Waggoner 1990). Esto sucede a pesar del inicio de tratamiento antes de los dos meses de edad, y del adecuado apego al tratamiento dietético, monitorizado mediante concentraciones séricas de galactosa 1 fosfato. Por esta razón se sugiere que el pronóstico cognitivo está relacionado con el genotipo, siendo la homocigosidad para la mutación Q188R la de peor pronóstico (Schweitzer 1993, Shield 2000). Las alteraciones verbales se han presentado en 56% de los pacientes con galactosemia, mayores de tres años, con 92% de estos pacientes descritos con retardo en el lenguaje, siendo la dispraxia verbal la principal alteración. No se ha encontrado una relación entre los problemas verbales y el tratamiento oportuno, únicamente se ha visto asociación con puntajes de IQ bajos y con problemas motrices (Waggoner 1990).

La alteración endocrinológica más frecuente es el hipogonadismo hipergonadotrópico en mujeres con galactosemia clásica. El espectro clínico varía desde la presencia de falla ovárica primaria severa hasta la menopausia temprana. El mecanismo de disfunción ovárica es desconocido con exactitud. (Ridell 2005). Se ha visto que el desarrollo de falla ovárica es más probable en pacientes con genotipo homocigoto para la mutación Q188R, así como con mediciones de galactosa-1-fosfato eritrocitaria mayores a 3.5mg/dl durante el tratamiento y oxidación corporal total de C galactosa menor al 5% (Guerrero 2000).

La alteración oftalmológica más frecuente es la presencia de cataratas en el periodo perinatal, la cual se ha observado hasta en un 30% de los pacientes con galactosemia. Aproximadamente la mitad se han descrito como leves, transitorias, neonatales y resolvieron con el tratamiento dietético. El tratamiento dietético en una descripción se menciona que se inició en promedio a los 77 días de vida en los pacientes que presentaron cataratas, comparado con el inicio de tratamiento en el día 20 en los pacientes que no las presentaron (Waggoner 2000).

## **Tratamiento**

En los pacientes con sospecha clínica para galactosemia o en aquellos detectados por medio de tamiz neonatal con sintomatología, se debe excluir la galactosa de la dieta. No se debe esperar hasta tener el resultado de los exámenes confirmatorios. Por lo tanto, se debe reemplazar la leche materna y fórmula maternizada a base de soya, excepto en pacientes con hepatopatía severa, en los cuales se debe iniciar una fórmula con triglicéridos de cadena media e hidrolizado de caseína, hasta que el cuadro agudo se resuelva (Ridel 2005).

En neonatos críticamente enfermos se debe iniciar medidas terapéuticas de sostén de acuerdo a la severidad de la hepatopatía, nefropatía y alteraciones en el sistema nervioso central. Habitualmente es necesaria la administración de líquidos parenterales, plasma y vitamina K, así como antibióticos. En cuanto a la ictericia, se debe utilizar fototerapia en pacientes con concentraciones séricas de albumina disminuidas, ya que aumenta el riesgo de kernicterus en ellos (Ridel 2005).

Los lactantes con riesgo de padecer galactosemia, por ejemplo, los hermanos de pacientes diagnosticados, no deben ser alimentados al seno materno o con fórmula hasta que se descarte 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. En estos pacientes se recomienda el análisis de genotipo, como previamente se mencionó, para establecer diagnóstico certero y definir conducta terapéutica, ya que si portan un genotipo con ambos alelos con mutación patológica (G/G) requieren iniciar manejo. Sin embargo, si tienen un genotipo G/D, no requieren excluir la lactosa de manera total en su alimentación (Clayton 2000).

Al iniciar ablactación en pacientes con diagnóstico confirmado de galactosemia, la práctica ideal ha sido reducir o intentar eliminar la galactosa de la dieta. Sin embargo, no existe una dieta sin galactosa, por lo que se recomienda una restricción definitiva de leche y lácteos en general.

A pesar de estas medidas, la dieta aún puede contener pequeñas cantidades de galactosa presente en frutas, verduras y leguminosas. Sin embargo, las

recomendaciones de una dieta estricta son controversiales, ya que se ha demostrado que la galactosa de síntesis endógena excede substancialmente las cantidades adquiridas en frutas y verduras, en medicamentos que contienen galactosa, o de otras fuentes en dietas estrictas. Se ha demostrado que la producción endógena de galactosa es mayor y más variable en niños que en adultos con galactosemia, pero la influencia de esto en el desarrollo neurológico no se conoce con exactitud (Ridel 2005).

## **Seguimiento**

El seguimiento de los pacientes con galactosemia clásica consiste en monitorizar a los pacientes con mediciones regulares de galactosa 1 fosfato eritrocitaria, así como con excreción urinaria de galactitol. De esta manera se puede detectar falta de apego a tratamiento, sin embargo es controversial la frecuencia para realizar dichas pruebas (Bosch 2006).

El seguimiento de los pacientes con galactosemia clásica debe estar dirigido hacia la detección temprana de las complicaciones. Se debe evaluar frecuentemente el neurodesarrollo en busca de alteraciones motoras, verbales o del desarrollo cognitivo. De igual manera todas las niñas deben ser evaluadas para diagnosticar la presencia de hipogonadismo hipergonadotrópico. Los pacientes con cataratas congénitas deben tener seguimiento regular por un oftalmólogo (Bosch 2006).

## **Genética**

La galactosemia es una enfermedad autosómica recesiva, con alteración en el gen que codifica a la galactosa-1-fosfato-uridiltransferasa localizado en el cromosoma 9p13. Tiene una longitud de 3900 pares de bases y codifica para un polipéptido de 379 aminoácidos con una masa estimada en 43 kilodaltones. El gen se organiza en 11 exones con 10 intrones (Ridell 2005).

Se han identificado más de 180 mutaciones diferentes y 11 polimorfismos en el gen *GALT*. La mutación más común en galactosemia clásica es Q188R, donde hay un cambio de glutamina en la posición 188 por arginina, resultado de la transición CAG>CGG en el exón 6. Esta es la mutación con mayor prevalencia a nivel mundial; en Europa occidental se encuentra en un 65% (Bosch 2006), y en latinos con una frecuencia de 50-58% (Wong 1996).

La mutación K285N, la sustitución de lisina por aspartato en el exón 9, resulta de la transversión AAG>AAT en el nucleótido 855. Esta es más rara que la Q188R, pero es la segunda más frecuente (Zekanowsky 1999). Su prevalencia en Europa es entre 25 y 35% de los alelos mutados.

La mutación IVS2-2A>G, se ha detectado únicamente en hispanos, mostrando una deficiencia leve de actividad enzimática en eritrocitos (Ng et al 1994).

La mutación pS135L es más frecuente en la población africana americana, en un 50% (Bosch 2006). Esta mutación tiene mayor actividad residual en hepatocitos y se asocia con un fenotipo menos grave (Ridel y Leslie 2005).

La variante N314D la cual actualmente se considera un polimorfismo y no una mutación patológica, se encuentra en el exón 10 y condiciona en la proteína el cambio de aspartato por asparragina, secundario a la transición AAC>GAC asociada con los alelos Duarte (D1 y D2).

La variante Los Ángeles o D1 se asocia con aumento de actividad enzimática, mientras que la variante Duarte (D o D2) presenta actividad enzimática reducida (Beutler 1965), la cual mejora con la edad; por lo que los individuos homocigotos para la variante Duarte 2 no requieren manejo. Diversos estudios *in vitro* han demostrado que N314D no afecta la actividad enzimática de *GALT* (Fridovich-Keil 1995a, Reichardt 1991).

N314D se encuentra en desequilibrio de ligamiento con otros cambios de base distintos en los alelos D1 y D2. La mutación “silenciosa” L218L, producida por la transversión CTA>TTA localizada en el exón 7, coexiste con N314D 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 N314D en los alelos D2 (Lin 1995).

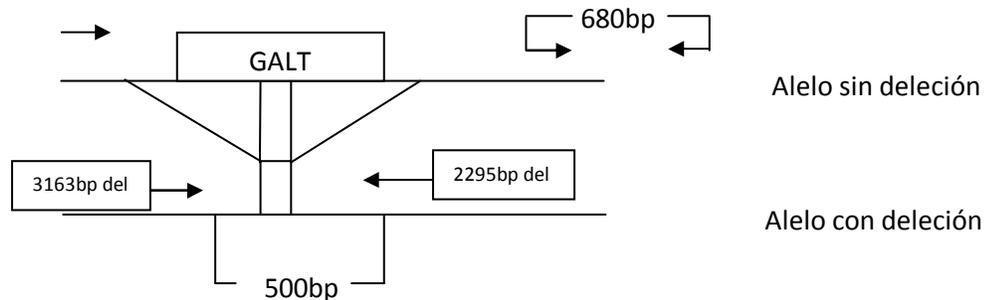
En el INP se cuenta con un proyecto de investigación aprobado por los comités de Investigación y Ética en el cual se han captado a la fecha 27 familias con actividad de *GALT* disminuida y algunos de ellos con fenotipo clínico compatible con Galactosemia clásica. En una primera etapa de este proyecto, se ha realizado el análisis molecular del gen observando en 19 casos las siguientes frecuencias: cinco pacientes fueron homocigotos para la mutación Q188R/Q188R, dos casos fueron heterocigotos Q188R/N314D, tres pacientes fueron heterocigotos compuestos, ya que se identificó la mutación Q188R en un alelo y en el otro no se ha caracterizado la mutación. Dos casos fueron homocigotos para la variante N314D/N314D (Duarte 2), en un paciente se identificó la variante N314D en un alelo, desconociendo la mutación en el otro alelo. Un paciente fue homocigoto para la mutación S135L, otro caso fue heterocigoto Q188R/IVS2-2A>G, un paciente heterocigoto N314D/S112R, un homocigoto F171S/F171S, un paciente homocigoto IVS2-2A>G/ IVS2-2A>G y finalmente en un individuo no se identificó la mutación en ningún alelo. De manera interesante en esta muestra analizada no se presentó la mutación K285N. A todos los alelos N314D se les determinó la presencia de los polimorfismos L218L e IVS5+62G>C para determinar si eran la variante Los Ángeles (D1) o Duarte D2, siendo todos Duarte 2 (Velázquez Aragón et al. 2008).

De las 27 familias captadas hasta el momento, al realizar el análisis molecular en los padres para corroborar que eran portadores, se identificaron tres familias que no mostraban un patrón mendeliano de herencia autosómica recesiva. Se identificó únicamente a uno de los padres como portador de la mutación caracterizada en el caso índice, pero el otro progenitor mostraba un genotipo de no portador; así en la primera familia (*GALT* 41) el genotipo del paciente era homocigoto N314D, con genotipo del padre N314D/- y de la madre -/-. En el segundo caso (*GALT* 115) y en el tercero (*GALT* 100) se observó en ambos un

genotipo homocigoto para N314D pero el genotipo de cada uno de los padres fue +/- y el de las madres N314D/N314D.

La explicación por la cual en estas tres familias uno de los progenitores no mostraba ser portador podría deberse a no paternidad biológica o a un fenómeno de disomía uniparental, ambas posibilidades fueron descartados por estudios moleculares previamente; sin embargo, la otra posibilidad es que los padres sean portadores de una deleción, la cual no se puede caracterizar por las técnicas moleculares hasta ahora realizadas en el laboratorio de Biología Molecular (Velázquez Aragón et.al. 2008).

En un estudio de Coffee y colaboradores (2006) se reportó una deleción de 5.5kb en el gen de *GALT* que condiciona en el análisis molecular un resultado aparentemente de homocigosidad para variantes localizadas en el otro alelo, lo que resulta en una potencial discrepancia entre el fenotipo bioquímico y el genotipo aparente de un individuo, así como una discordancia entre el genotipo aparente del paciente y el genotipo de sus padres, como lo observado en las tres familias mexicanas descritas previamente. Coffee y cols, al caracterizar la deleción, determinó que es una deleción compleja en la que dos segmentos del gen *GALT* están ausentes: un segmento de DNA de 3,163pb que contiene el extremo 5' del gen que incluye al promotor y un segmento de 2,395pb del extremo 3' del gen; mientras que un segmento interno de 117pb del gen *GALT* no se pierde con la deleción el cual contiene porciones del exón 8 y del intrón 8.



**Figura 1.** Ensayo de PCR para la deleción de 5.5 kb en el gen *GALT*, diagrama esquemático ilustrando la localización de los tres primers utilizados en el ensayo. Los tamaños de los productos de PCR para el alelo sin deleción y el alelo con deleción se indican (Coffee 2006).

## II. JUSTIFICACIÓN

Se ha descrito una deleción de 5.5kb en el gen *GALT* en pacientes con galactosemia clásica. En el INP se tienen captadas actualmente 27 familias con actividad de la enzima *GALT* disminuida con análisis de genotipo. Dentro de estas 27 familias, existen tres que no siguen el patrón de herencia mendeliano autosómico recesivo esperado para esta patología; debido a que uno de los progenitores presenta un genotipo aparentemente de no portador.

Previamente se han descartado posibles explicaciones a este hallazgo como la no paternidad o disomía uniparental, por lo que consideramos q-ue es de suma importancia conocer si en estas familias se encuentra presente la deleción de 5.5kb en el gen *GALT*. Esto explicaría el genotipo discrepante encontrado entre los pacientes y sus padres, lo cual permitirá brindar un asesoramiento genético de certeza en estas familias. Además, dado que la presencia de la deleción de 5.5kb, podría condicionar errores de asignación de genotipo en las otras 24 familias, también es importante descartar en ellas la presencia de la deleción.

### III. OBJETIVO

#### OBJETIVO GENERAL

1. Realizar el análisis molecular para identificar la delección de 5.5kb en el gen *GALT* en pacientes considerados con galactosemia clásica.

#### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar en tres familias con genotipo N314D que no siguen el patrón de herencia mendeliano autosómico recesivo, si esto es debido a la presencia de la delección de 5.5kb en el gen *GALT*.
2. Determinar si en pacientes con galactosemia clásica, con genotipo analizado previamente en el laboratorio de Biología Molecular del INP, pudiera existir un error de asignación de este último por la presencia de la delección de 5.5kb en el gen *GALT*.
3. Brindar asesoramiento genético a las familias de acuerdo al análisis molecular.

## IV. MATERIAL Y MÉTODOS

Este estudio es parte de un proyecto de investigación que se realiza en el Laboratorio de Biología Molecular, autorizado por los Comités de Investigación y Ética, (autorización 18/2007) para identificar las mutaciones en el gen *GALT* en pacientes mexicanos. Los pacientes son captados a través de la Unidad de Genética de la Nutrición, con diagnóstico de galactosemia clásica por la ausencia o disminución de actividad enzimática de *GALT* documentada por una prueba de Beutler con ausencia de actividad enzimática y/o ausencia de *GALT* en el tamiz neonatal ampliado o por presencia de galactosuria en prueba cualitativa y/o cifras de galactosa total en sangre mayores a 14 mg/dL. En este trabajo para obtener la tesis de Especialidad en Pediatría, la tesista participó en el análisis molecular para la detección de la mutación tipo deleción de 5.5kb en el gen *GALT* en los 27 pacientes hasta ahora captados en el proyecto 18/2007.

### CRITERIOS DE INCLUSIÓN

1. Pacientes con diagnóstico confirmado de galactosemia clásica con genotipo analizado.
2. Cualquier género y edad
3. Padres de pacientes con diagnóstico confirmado de galactosemia clásica, con asignación de genotipo.
4. Firma de carta de consentimiento informado para casos índice y familiares.

### CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

1. Padres no biológicos del caso índice.

### MUESTRA DE DNA

Se trabajó con el DNA obtenido previa firma de consentimiento informado y que se encuentra almacenado en el laboratorio de Biología Molecular con el cual se está realizando el estudio molecular del gen *GALT*. El DNA se obtuvo 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 padres. Las muestras de DNA se conservan a 4°C hasta su análisis.

### Amplificación de PCR para detección de la deleción de 5.5 Kb

Se amplificaron segmentos del gen *GALT* utilizando 0.2UI de Taq Gold™ polimerasa, en la presencia de 3µl de buffer, 3 µl de MgCl<sub>2</sub>, 1 µl de dNTPs, 0.5 µl de los primers. Las condiciones de PCR fueron 94°C por 10 minutos, seguido de 39 ciclos (94°C por 40 segundos, 59°C por 40 segundos, 72°C por 1 minuto), 72°C por 10 minutos.

Para la amplificación del fragmento de unión que se origina ante la deleción de 5.5 kb se utilizaron los primers específicos para la detección de la deleción:

- -1164F 5'-AG-TACCAGGGGAGGAATTAATTTGAATTTT-3';
- + 4795R 5' -GTGTGATTTCCCCACCCACAGG-3'.

Para la amplificación de un alelo de *GALT* sin deleción se utilizó un tercer primer

- +4116F primer -5'-CTT-GTGT-CTTGGTTGTGGCTGGAGG-3'

El producto de PCR se corrió en un gel de agarosa al 2%, obteniéndose un producto de 680bp en ausencia de la deleción, y uno de 500pb si presenta la deleción de 5.5kb, ya que el segmento de DNA de 500pb abarca los puntos de ruptura de la deleción de *GALT*.

## VARIABLES ESTUDIADAS

En el caso índice:

- Variables
- Sexo: cualitativa, categórica nominal, dicotómica
- Edad: cuantitativa, numérica, discreta
- Diagnóstico de galactosemia: Prueba de Guthrie sin actividad enzimática, actividad enzimática baja o ausente de *GALT en eritrocitos*, niveles de galactosa altos en suero o por cuadro clínico compatible.
- Genotipo: Constitución genética de un individuo para el gen *GALT* en el locus 9p13.
- Genotipo posterior al análisis molecular de la deleción de 5.5kb del gen *GALT*: Constitución genética de un individuo después del análisis mediante amplificación de PCR para detección de la deleción de 5.5kb del gen *GALT*.

En los padres:

- Genotipo en la madre previo al presente estudio
- Genotipo en el padre previo al presente estudio
- Genotipo en la madre posterior al análisis molecular de la deleción de 5.5kb del gen *GALT*
- Genotipo en el padre posterior al análisis molecular de la deleción de 5.5kb del gen *GALT*

## **V. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.**

Se determinó la frecuencia de la presencia de la deleción de 5.5kb en la muestra analizada, la cual se reportó en porcentajes.

## **VI. CONSIDERACIONES ÉTICAS.**

Este trabajo fue parte de un protocolo de investigación, ya se cuenta con el consentimiento informado del padre o tutor de los pacientes, para la obtención, tanto de él como del paciente, 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.

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.

## VII. RESULTADOS

Se ha realizado el análisis molecular para la delección de 5.5kb en el gen GALT en 27 familias con galactosemia clásica captadas en el INP. Se encontró presente dicha delección en 3 alelos; lo que representa el 5.5% de los 54 alelos analizados, estos tres casos presentaban un genotipo discrepante entre los pacientes y sus padres. En las 24 familias restantes no se documentó la presencia de la delección.

En el paciente con el registro GALT41, masculino, a la edad de un mes de nacido se observó la galactosa total en sangre normal (<14 mg/dL), pero la actividad de GALT fue baja (0 – 3 U/gHb). A partir de estos resultados se le retiró la leche materna, llevando una dieta restringida en galactosa, sustituida por fórmula a base de soya. El paciente presentó como sintomatología una catarata congénita incipiente. Posterior a iniciar una dieta restringida se le realizó la prueba de Beutler confirmando que no tenía actividad enzimática. Una segunda medición de la actividad de GALT fue de 6 U/gHb y la medición de galactosa total en sangre fue de 1.6 mg/dL, estando dentro del rango de referencia (<14 mg/dL); en cuanto a la medición de galactosuria se determinó que ésta estuvo presente.

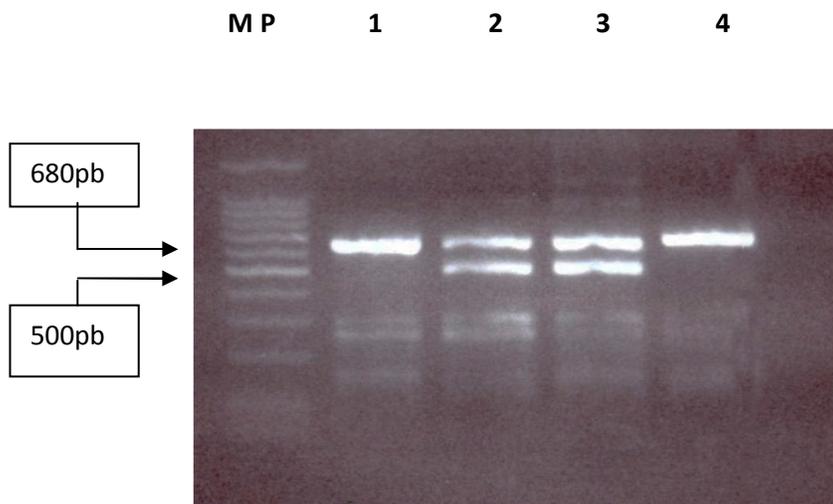
El paciente GALT100, masculino, no presentó ningún tipo de sintomatología; en la prueba de Beutler realizada se determinó que no presentaba actividad enzimática y no se realizó el análisis para determinar galactosuria; en cuanto a la actividad de GALT esta fue de 13.8 U/gHb encontrándose en un nivel deficiente moderado (3 – 18 U/gHb) y su galactosa total en sangre fue mayor a 14 mg/dL (valor de referencia <14 mg/dL).

El paciente GALT 115, masculino, tiene su lugar de origen en el D. F. mientras que su familia procedía de una población endogámica; el único síntoma que presentó fue ictericia; la prueba de Beutler determinó que no presentaba actividad enzimática, en este caso no se determinó presencia de galactosuria. La actividad de GALT fue de 5.6 U/gHb, la cual se encuentra dentro del rango de deficiente moderado (3 – 8 U/gHb) y su galactosa total en sangre de 2.3 mg/dL (valor de referencia de Mayo Clinic Laboratory Service Report).

## RESULTADOS MOLECULARES EN CASOS ÍNDICE Y FAMILIA.

### PACIENTE *GALT* 41.

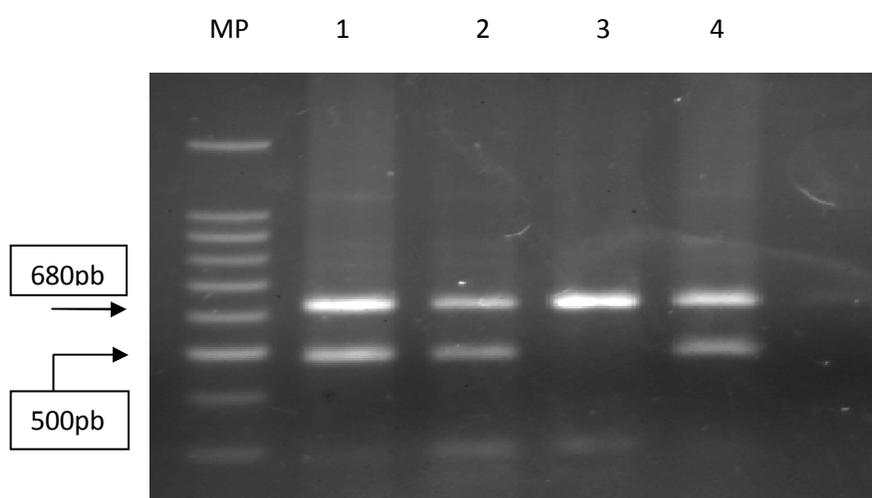
	GENOTIPO INICIAL	GENOTIPO POSTERIOR A ANALISIS MOLECULAR DE LA DELECIÓN
<b>PACIENTE (41)</b>	N314D/N314D	Heterocigoto compuesto: deleción de 5.5kb/N314D
<b>MADRE (42)</b>	-/-	Heterocigota: deleción de 5.5kb/-
<b>PADRE (43)</b>	N314D/-	N314D/-



**Imagen 1.** Análisis de la deleción de 5.5 kb en paciente y su familia. Gel de agarosa al 2%. Carriles 1 al 4: padre, paciente *GALT* 41, madre, muestra control sin deleción 5.5kb respectivamente. Se identifica el patrón de bandas acorde a la presencia de la deleción en estado heterocigoto con un producto de PCR de 500pb así como una banda correspondiente a un tamaño de 680 pb del alelo normal observado en los carriles 2 y 3. En los alelos sin mutación el producto amplificado es de 680pb (carriles 1 y 4). MP: marcador de peso molecular.

## PACIENTE *GALT* 100

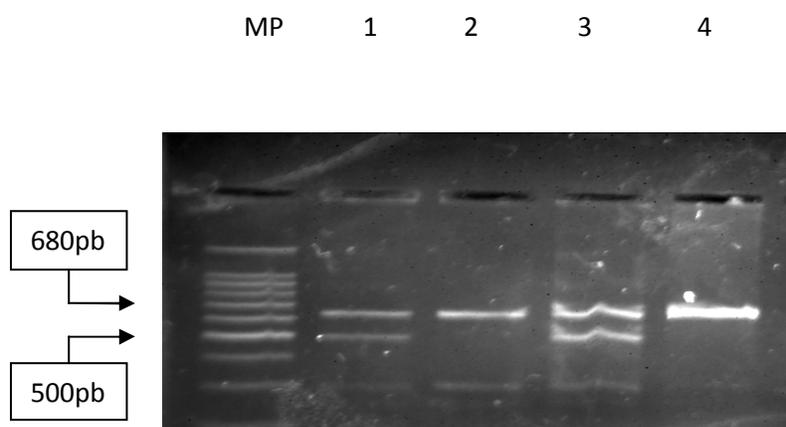
	GENOTIPO INICIAL	GENOTIPO POSTERIOR A ANALISIS MOLECULAR DE LA DELECIÓN
<b>PACIENTE (100)</b>	N314D/N314D	Heterocigoto compuesto: deleción de 5.5Kb/N314D
<b>MADRE (101)</b>	N314D/N314D	N314D/N314D
<b>PADRE (102)</b>	-/-	Heterocigoto: deleción de 5.5Kb/-



**Imagen 2.** Análisis de la deleción de 5.5 kb en paciente y su familia. Gel de agarosa al 2%. Carriles 1 al 4: padre (*GALT* 102), paciente *GALT* 100, madre (*GALT* 101), muestra control con deleción 5.5kb (*GALT* 41) respectivamente. Amplificación de segmento de gen *GALT* para la identificación de la deleción en estado heterocigoto con un producto de PCR de 500pb así como una banda de 680 pb del alelo normal, observado en los carriles 1, 2 y 4 correspondientes al padre y paciente así como para el control con la deleción. En la madre se observa sólo el producto amplificado de 680pb correspondiente a la presencia de alelos sin la deleción de 5.5 kb (carril 3). MP: marcador de peso molecular.

### PACIENTE *GALT* 115

	GENOTIPO INICIAL	GENOTIPO POSTERIOR A ANALISIS MOLECULAR DE LA DELECIION
<b>PACIENTE (115)</b>	N314D/N314D	Heterocigoto compuesto: deleción de 5.5Kb/N314D
<b>MADRE (116)</b>	N314D/-	N314D/-
<b>PADRE (117)</b>	-/-	Heterocigoto: deleción de 5.5Kb/-

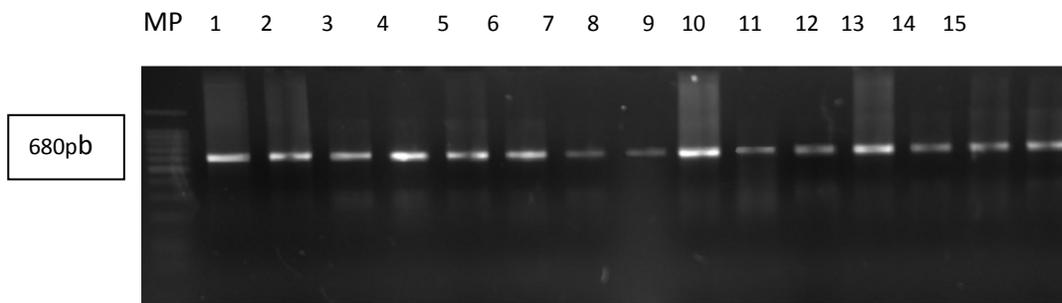


**Imagen 3.** Análisis de la deleción de 5.5 kb en paciente y su familia. Gel de agarosa al 2%. Carriles 1 al 4: paciente (*GALT* 115), madre *GALT* 116, padre (*GALT* 117), muestra control sin deleción 5.5kb respectivamente. Amplificación de segmento de gen *GALT* para la identificación de la deleción en estado heterocigoto con un producto de PCR de 500pb así como una banda de 680 pb del alelo normal, observado en los carriles 1 y 3 correspondientes al paciente y padre respectivamente. En la madre y el control, se observa sólo el producto amplificado de 680pb correspondiente a la presencia de alelos sin la deleción de 5.5 kb (carriles 2 y 4). MP: marcador de peso molecular.

**GENOTIPO DE 24 PACIENTES GALT SIN PRESENCIA DE LA DELECCIÓN DE 5.5KB**

	<b>GENOTIPO INICIAL Y POSTERIOR A ANALISIS MOLECULAR DE LA DELECCIÓN DE 5.5KB EN EL GEN GALT.</b>
<b>GALT 1</b>	Q188R/Q188R
<b>GALT 3</b>	S135L/S135L
<b>GALT 4</b>	N314D/Q188R
<b>GALT 6</b>	F171S/F171S
<b>GALT 11</b>	Q188R/Q188R
<b>GALT 14</b>	?/?
<b>GALT 17</b>	Q188R/?
<b>GALT 19</b>	Q188R/Q188R
<b>GALT 21</b>	Q188R/N314D
<b>GALT 25</b>	IVS2-2A>6/IVS2-2A>6
<b>GALT 27</b>	Q188R/Q188R
<b>GALT 30</b>	N314D/N314D
<b>GALT 33</b>	Q188R/IVS2-2A>6
<b>GALT 36</b>	Q188R/Q188R
<b>GALT 40</b>	N314D/S112R
<b>GALT 44</b>	Q188R/?
<b>GALT 53</b>	N314D/?
<b>GALT 56</b>	Q188R/?
<b>GALT 70</b>	N314D/?
<b>GALT 78</b>	Q188R/?
<b>GALT 85</b>	Q1885/N314D
<b>GALT 91</b>	?/?
<b>GALT 106</b>	N314D/?

<b>GALT 120</b>	N314D/?
-----------------	---------



**Imagen 4.** Análisis molecular de la delección de 5.5 kb en pacientes con actividad de GALT disminuida y genotipo analizado en el gen *GALT*. Gel de agarosa al 2%, amplificación del segmento del gen *GALT* en donde en los carriles del 1 al 15 se observa una banda correspondiente a 680 pb que descarta la presencia de la delección. MP: marcador de peso molecular.

## VIII. DISCUSIÓN

La sospecha de galactosemia en los pacientes inicia con la presencia de manifestaciones clínicas en el periodo neonatal o por una prueba de tamiz neonatal con actividad de *GALT* baja o ausente. A partir de este punto, se realizan pruebas diagnósticas confirmatorias con medición bioquímica de la actividad enzimática de *GALT* en eritrocitos, niveles de galactosa en sangre así como genotipificación del gen *GALT* (Bosch 2006).

A la fecha se han descrito más de 180 mutaciones en el gen *GALT*; se refiere en la literatura que de acuerdo al genotipo asignado, se puede predecir la actividad de la enzima *GALT* y el fenotipo de los pacientes. Es importante destacar que en caso de que los pacientes presenten la variante de *GALT* N314D, éstos no se consideran galactosémicos, ya que actualmente se conoce que N314D es un polimorfismo o variante normal en el gen *GALT*. El polimorfismo N314D se encuentra en desequilibrio de ligamiento con otros cambios de base que distingue a los alelos Duarte 1 de Duarte 2. Se ha descrito que individuos heterocigotos para el alelo normal y Duarte 2 (N/D), presentan una actividad enzimática del 75%; los homocigotos para el alelo Duarte (D/D) la reducen al 50%; y los heterocigotos compuestos para el alelo Duarte y un alelo de la galactosemia clásica (D/G), suelen tener una actividad disminuida al 25%, existen reportes que indican que los pacientes no requieren un manejo dietético estricto cuando no presentan manifestaciones clínicas dado que los niveles bajos de actividad de *GALT* son transitorios y alcanzan niveles normales en el primer año de vida (Izquierdo y Avellaneda 2004).

Por otro lado, dada la herencia autosómica recesiva de la galactosemia, se espera que los padres sean clínicamente sanos pero portadores de un alelo mutado, lo cual se ha corroborado en la mayoría de las familias con pacientes con galactosemia al determinar el genotipo de los padres (Ridell 2005). En los 27 pacientes con galactosemia captados en el INP había 3 pacientes con discrepancia entre su genotipo homocigoto N314D y el genotipo de sus padres, ya que no se corroboró inicialmente el estado de portador en ambos y dos de los pacientes además presentaban sintomatología, lo cual no es lo esperado para los pacientes homocigotos N314D.

En el año 2006 Coffee y cols. reportaron de igual manera, una discordancia entre el fenotipo bioquímico y el genotipo de *GALT* en dos familias. En el primer caso, se encontró un paciente catalogado como homocigoto para la variante N314D, que presentó actividad de *GALT* en 35%, siendo un valor más consistente con un fenotipo D/G que con el fenotipo D/D. Al realizar el análisis molecular en los progenitores, el padre era homocigoto para la variante Los Angeles, con la cual se espera observar una actividad enzimática de *GALT* elevada; sin embargo, mostraba actividad de 51%. Mientras tanto, la madre contaba con genotipo N314D/-, consistente con el fenotipo bioquímico D/N.

En la segunda familia descrita por Coffee y cols. el paciente era inicialmente homocigoto para N314D, con actividad bioquímica esperada de D/D, sin embargo, como el primer paciente, éste tenía un fenotipo bioquímico consistente con D/G. El padre de este paciente tenía un genotipo heterocigoto para la variante N314D, con actividad de enzima GALT consistente con D/N. En la madre no se identificó mutación alguna, sin embargo, ella presentaba un fenotipo bioquímico G/N, lo que sugería que ella era portadora de una mutación infrecuente en el gen *GALT*. De esta manera, se encontraba una discrepancia entre el genotipo y el fenotipo bioquímico esperado tanto en el paciente como en uno de sus padres.

En las dos familias previas, Coffee y cols. sospecharon en la presencia de una deleción previamente reportada (Elsas y cols., 1998). Al realizar el análisis molecular buscando la deleción de 5.5kb la encontraron tanto en los pacientes como en los padres que presentaban el fenotipo bioquímico discordante. Se concluyó que la presencia de la deleción de 5.5kb en uno de los alelos resulta en aparente homocigosidad para la variante en el alelo opuesto lo que ocasiona errores en la asignación de genotipo y discordancia entre el fenotipo bioquímico y el genotipo aparente (Coffee 2006).

La deleción de 5.5kb se ha reportado en 7 alelos en cuatro familias no relacionadas de Judíos Ashkenazi (Elsas y cols., 1998). En el estudio de Coffee de 2006, la identificó en 7 alelos al estudiar 6 casos. De estos, se identificaron algunos con apellido de origen hispánico, sin precisar la cifra (Coffee 2006). Debido a estos antecedentes y por el origen étnico de nuestras familias, se consideró que existía la posibilidad de que la misma deleción de 5.5kb se encontrara presente en nuestra población y explicara las discrepancias observadas en el fenotipo y en el estudio molecular familiar, por lo que se realizó el análisis molecular correspondiente.

En la población estudiada, la frecuencia de la deleción de 5.5kb en 54 alelos analizados fue de 5.5%. De acuerdo a Velázquez-Aragón (2008), las mutaciones de *GALT* que con mayor frecuencia se presentan en la población con galactosemia captada en el INP son Q188R en el 42.1% de alelos analizados, N314D en 21%, IVS2-2A>G en 7.9%, S135L y F171S en 5.3% y finalmente S112R en el 2.6% de los alelos. La frecuencia observada de la deleción en este estudio justifica el incluir su análisis en nuestra población, siendo sobretodo relevante buscarla ante la presencia de discrepancia de fenotipo o genotipo en los pacientes o en sus familias. A continuación se discuten los tres casos en quienes se identificó la deleción de 5.5kb.

En el caso de *GALT* 41, inicialmente considerado homocigoto para la variante N314D (D2), se observó al diagnóstico como única manifestación clínica una catarata congénita. La actividad de *GALT* en eritrocitos estaba disminuida, sin embargo, la presencia de catarata congénita no es esperada en pacientes

homocigotos N314D (Fridovich-Keil 1995a, Reichardt 1991), por lo que presentaba una discrepancia entre el genotipo y el fenotipo clínico esperado.

En el estudio de la familia del caso GALT 41, inicialmente el padre fue catalogado como portador de un alelo N314D (D2), pero no se encontró en la madre esta variante, lo cual no era lo esperado de acuerdo a la herencia de la enfermedad, lo que sugirió que podría ser portadora de la delección 5.5 kb. Al realizar el análisis molecular se corroboró la presencia de la delección de 5.5kb de *GALT*, tanto en el paciente como en su madre, lo cual explica la discrepancia que se había observado al estudiar el genotipo en la madre.

Aún no se han documentado con exactitud las manifestaciones clínicas presentes en los pacientes que tienen la delección de 5.5kb (Coffee 2006), por lo que no se tiene establecida una correlación genotipo-fenotipo, por ello, no podemos definir si el hallazgo de la catarata observada en nuestro caso era un dato clínico esperado. El tratamiento instaurado en este paciente, por el hecho de tener catarata así como por la identificación de un nivel de GALT bajo fue restricción en la dieta y se mantiene con un seguimiento clínico y bioquímico. Este caso ejemplifica la necesidad de descartar la delección de 5.5 kb en pacientes en donde el genotipo no está acorde al fenotipo clínico observado y la importancia de corroborar en los padres el estado de portador mediante el estudio molecular para brindar un asesoramiento genético más certero.

El caso *GALT* 100 no presentó sintomatología a pesar de tener una actividad de *GALT* eritrocitaria disminuida pero con un genotipo homocigoto N314D (D2), este caso se comporta de acuerdo a la literatura, en la cual se refiere que los homocigotos N314D no presentan manifestaciones clínicas y la actividad de *GALT* disminuida es transitoria (Fridovich-Keil 1995a, Reichardt 1991); sin embargo, al realizar el genotipo de los padres se encontró que la madre es homocigota N314D (D2) y el padre inicialmente no se catalogo como portador, lo cual no es lo esperado en la herencia autosómica recesiva. Esta discrepancia se explicó al identificar la delección de 5.5kb en el gen *GALT*, tanto en el paciente como en su padre; por lo que este caso también corrobora la importancia de demostrar que los padres son portadores mediante estudio molecular.

Dado que el paciente no presenta sintomatología, requiere un seguimiento médico con medición de la actividad de *GALT* y niveles de galactosa en sangre para establecer manejo a seguir dado que si mantiene niveles normales de galactosa y la actividad de *GALT* se observa con el tiempo en rangos normales, consideramos que no requerirá una restricción de lactosa en la dieta. Se requiere un seguimiento a largo plazo de los pacientes con la delección de 5.5kb, dado que como previamente se mencionó, no se ha establecido una correlación fenotipo-genotipo y tampoco se encuentra definido el tratamiento a seguir en estos casos (Coffee 2006). Por el otro lado, el observar a la madre de nuestro caso, que es homocigota N314D, sin manifestaciones clínicas apoya que esta es una variante polimórfica y no una mutación patológica.

El caso *GALT* 115, quien es homocigoto N314D (D2), presentó ictericia al diagnóstico así como actividad de *GALT* en eritrocitos disminuida, llamando la atención la discrepancia entre el genotipo y el fenotipo clínico (Fridovich-Keil 1995a, Reichardt 1991). El estudio molecular en los padres mostró que la madre es portadora de la variante N314D (D2), pero el padre no. Al realizar el análisis de la delección de 5.5kb del gen *GALT* se identificó la delección en el padre y en el paciente. Al igual que en el paciente *GALT* 100, el manejo con la dieta debe establecerse de acuerdo a un monitoreo médico estrecho y con medición de niveles de galactosa en sangre para corroborar apego al tratamiento. Este caso es un ejemplo más de la necesidad de buscar la delección en pacientes cuyo genotipo este discrepante con el fenotipo clínico esperado o cuando no se observe una concordancia en el genotipo de los progenitores.

Interesantemente en nuestros tres pacientes la delección de 5.5kb del gen *GALT* se encontró asociada con la variante N314D únicamente. En la literatura se ha reportado esta misma situación, sin reportes de asociación de la delección con otras mutaciones o variantes en el gen *GALT* (Coffee 2006). Sin embargo el número total de pacientes aun es pequeño, por lo que todavía se requiere una mayor descripción de pacientes para establecer si la delección de 5.5kb sólo se observa en casos en donde en el otro alelo portan la variante N314D.



## IX. CONCLUSIONES

1. En 3 pacientes en quienes al realizar el estudio familiar se observó una discrepancia con el genotipo de sus padres, se identificó la delección de 5.5kb en el gen *GALT*.
2. La frecuencia de la delección de 5.5 kb fue de 5.5% en 54 alelos estudiados, por lo que sugerimos incluirla dentro del análisis de genotipo de galactosemia en nuestra población.
3. La delección de 5.5 kb se había reportado previamente en pacientes Judíos Ashkenazi, sin embargo, en nuestros casos no se tiene el antecedente de este origen étnico, por lo que consideramos que esta mutación no es exclusiva de un grupo étnico en particular y debe de buscarse en otras poblaciones de pacientes con galactosemia como la nuestra.
4. Dos de nuestros casos en los que identificamos la delección de 5.5kb presentaron manifestaciones clínicas y uno no, dado el número bajo de pacientes descritos, desconocemos la correlación entre genotipo y fenotipo así como el manejo que se requiere en estos pacientes de manera certera, por lo que se requieren más estudios al respecto en un futuro.
5. En nuestros tres pacientes la delección de 5.5 kb la observamos asociada sólo a la variante N314D en el otro alelo, por lo que se requerirán más estudios para determinar si esta asociación es consistente o se puede presentar con otras variantes o mutaciones patológicas en el gen *GALT*.

## APÉNDICE 1

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

México, D. F., a \_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_

Por medio de la presente hago constar que estoy de acuerdo en que yo y mi hijo (a) \_\_\_\_\_ participemos en el proyecto **“IDENTIFICACIÓN DE MUTACIONES POCO FRECUENTES Y NUEVAS 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, 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. Tel. 10840900 ext. 1306.

## APÉNDICE 1.1

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

México, D. F., a \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20 \_\_\_\_

Por medio de la presente hago constar que yo, \_\_\_\_\_, estoy de acuerdo en participar en el estudio **“IDENTIFICACIÓN DE MUTACIONES POCO FRECUENTES Y NUEVAS 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. Tel. 10840900 ext. 1306.

## APÉNDICE 2

### IDENTIFICACIÓN DE MUTACIONES POCO FRECUENTES Y NUEVAS 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:

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: \_\_\_\_\_

X. BIOLOGÍA MOLECULAR

Mutación Q188R

Mutación N314D

L218L

IVS5+62G>A

Mutación K285N

Mutación S135L

Exón con alteración en la migración en SSCP \_\_\_\_\_

Resultado secuenciación \_\_\_\_\_

Resultado estudio molecular de la delección de 5.5kb \_\_\_\_\_

## XI. BIBLIOGRAFÍA

1. Beutler E, Baluda MC. 1965. A new genetic abnormality resulting in galactose-1-phosphate uridyltransferase deficiency. *Lancet*. 1:353-355.
2. Beutler E, Baluda MC. 1966. A simple spot screening test in galactosemia. *J Lab Clin Med*. 68: 137.
3. Bosch A. 2006. Classical galactosemia revisited. *J Inherit Metab Dis* 29: 516-525
4. Bosch A., Grootenhius M. 2004. Living with Classical Galactosemia: Health-Related Quality of Life Consequences. *Pediatrics*. 113: 423-428.
5. Clayton PE. Recommendations for the management of galactosemia. 2000. *Arch Dis Child*. 82: 336-337.
6. Coffee, B Hjelm, L. 2006. Characterization of an unusual deletion of the galactose-1-phosphate uridyl transferasa (*GALT*) gene. *Genet Med*. 8: 635-640
7. Doménech E, Castro R. 1990. *Trastornos congénitos del metabolismo de la galactosa. Monografías de Pediatría*. 63: 26-35.
8. Elsas LJ, Kent L. 1998. The molecular biology of galactosemia. *Genet Med*. 1: 40-48.
9. Fridovich-Keil J, Booth-Quimby B, Wells L, 1995a. Characterization of the N314D allele in human galactose-1-phosphate uridyltransferase using a yeast expression system. *Biochem Mol Med*. 56: 121-130.
10. Gitzelmann R, Bosshard NU. 1995. Partial deficiency of galactose-1-phosphate uridyltransferase. *Eu J Pediatr* . 154: S40.
11. Guerrero NV, Dingh RH. 2000. Risk factors for premature ovarian failure in females with galactosemia. *J Pediatr* 137(6):833-841
12. Holton JB, Leonard JV. 1994. Clouds still gathering over galactosemia. *Lancet*. 334: 1242-1243.
13. Izquierdo y Avellaneda. 2004. *Enfermedades raras. Un enfoque práctico*. Instituto de Investigación de Enfermedades Raras. Instituto de Salud Carlos III. Ministerio de Sanidad y Consumo 1er. Ed.

14. Lin H, Reichadt J. 1995. Linkage disequilibrium between Sac I restriction fragment length polymorphism and two galactosemia mutations. *Hum Genet.* 95: 353-355.
15. Litchfield WJ, Wells WW. 1978. Effects of galactose on free radical reactions of polymorphonuclear leucocytes. *Arch Biochem Biophys.* 188: 26-30.
16. Nelson MD, Wolf JA, Cross CA. 1992. Galactosemia: evaluation with MR imaging. *Radiology.* 184: 255-261.
17. New England Newborn Screening Program (NENSP) 305 South Street Jamaica Plain, Medical Laboratories in Boston Massachusetts 02130, Telephone 617-983-63-00, Fax 617-522-28-46.
18. Ng WG, Xu YK, 1994. Biochemical and molecular studies of 132 patients with galactosemia. *Hum Genet* 94: 359-363.
19. Pesce MA, Bodourian SH. 1982. 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.* 28: 301-305.
20. Reichardt J, Woo S. 1991. Molecular characterization of two galactosemia mutations: correlation of mutations with highly conserved domains in galactose-1-phosphate uridylyltransferase. *Am J Hum Genet.* 49: 860-867.
21. Ridel, K. Leslie, N. 2005 An Updated Review of the Long-term Neurological Effects of Galactosemia. *Pediatr Neurol.* 33: 153-161
22. Schweitzer S, Shin Y 1993. Long-term outcome in 134 patients with galactosemia. *Eur J Pediatr* 152:36-43
23. Shield, J P H, Wadsworth EJK, 2000. The relationship of genotype to cognitive outcome in galactosemia. *Arch Dis Child* 83: 248-250
24. Velázquez-Aragón J, Alcántara-Ortigoza M.A. Vela-Amieva, M., Monroy, s., Martínez-Cruz V., Todd-Quiñones, C., González del Ángel, A. 2008. Low allelic heterogeneity in a sample of mexican patients with classical galactosemia. *J Inh Met Dis*, Online.
25. Waggoner DD, Buist NRM. 1990. Long-term prognosis in galactosemia: results of a survey of 350 cases. *J Inherit Metab Dis* 13: 802-818

26. Wong LJ, Xu YK, Wanr BT. 1996. Genotyping of 277 galactosemia patients. *Am J Human Genet.* 59 (suppl): A295 (resumen).
27. Zekanowsky C, Radomska B. 1999. Molecular characterization of Polish patients with classical galactosemia. *J Inher Metabol Dis.* 22: 679