

**Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre
Disciplina de Genética Básica**

DOENÇA DE TAY-SACHS

**Caroline Gregoletto Molinari
Maria Julia Machline Carrion
Melissa Fernanda Steigleder
Monitor: Rafael Bonfá**

Outubro/2001

RESUMO

A Doença de Tay Sachs (DTS) é uma gangliosidose na qual há o acúmulo de gangliosídeo G_{M2} nas células neuronais. Esse acúmulo gangliosídico deve-se a um defeito na enzima hexosaminidase A (Hex A) decorrente de mutações no seu gene codificador, o gene HEXA, o que resulta em diferentes fenótipos (agudo, subagudo, crônico e variante B1). Essa desordem exibe um padrão de herança autosômico recessivo e é particularmente prevalente entre os judeus Ashkenazi, população para a qual sugere-se programas de rastreamento. Ainda hoje não há terapia efetiva para a DTS, no entanto, diversas técnicas têm sido desenvolvidas.

PALAVRAS-CHAVE: Doença de Tay Sachs, gene HEXA, hexosaminidase A, mutações, judeus Ashkenazi.

ABSTRACT

Tay Sachs Disease is a gangliosidosis in which there is storage of G_{M2} ganglioside in neurons. This gangliosidic storage is owned to an enzymatic defect in Hex A enzyme due to mutations in its encoding gene, HEXA gene, resulting in different phenotypes (acute, subacute, chronic and B1 variant). This disorder exhibits a recessive autosomic inheritance pattern and it is particularly prevalent between Ashkenazi jews; screening programs are suggested for this population. Yet today there is no effective therapy for Tay Sachs Disease, however, several technics are being developed.

KEYWORDS: Tay Sachs Disease, HEXA gene, hexosaminidase A, mutations, Ashkenazi jews.

INTRODUÇÃO

A doença de Tay-Sachs (DTS), uma gangliosidose G_{M2} que apresenta um padrão de herança autossômico recessivo, é uma desordem neurodegenerativa, na qual ocorre um acúmulo intralisossomal do gangliosídeo G_{M2} devido à deficiência da enzima hexosaminidase A, particularmente nas células neuronais.

As gangliosidoses G_{M2} possuem três formas de apresentação clínica: a DTS e variantes, que são associadas com a deficiência da enzima hexosaminidase A (Hex A), mas com atividade normal da enzima hexosaminidase B (Hex B); a doença de Sandhoff e variantes, que são associadas com a deficiência na atividade de ambas as enzimas Hex A e Hex B e a deficiência da proteína G_{M2} ativador, caracterizada por Hex A e Hex B normais, mas com inabilidade de formar o complexo gangliosídeo G_{M2}/G_{M2} ativador funcional.

A importância do estudo sobre a DTS deve-se à sua alta prevalência na população de judeus Ashkenazi, além do acometimento, apesar de menos significativo, na população em geral. Além disso, os fenótipos da DTS variam extensamente, desde a forma aguda, ou infantil, doença neurodegenerativa rapidamente progressiva que culmina com a morte antes dos quatro anos de idade; até a forma de início tardio, subaguda ou crônica, que são condições neurológicas mais lentamente progressivas compatíveis com a sobrevida na infância ou adolescência (forma subaguda) ou uma sobrevida, à longo prazo,

(forma crônica ou de início na vida adulta). São reconhecidas, também, a variante B1 da DTS e a pseudodeficiência da Hex A.

Os programas de rastreamento de heterozigotos e o diagnóstico pré-natal auxiliam na diminuição da taxa de incidência da doença, assim como o aconselhamento genético esclarece os casais de risco sobre a possibilidade de virem a gerar um concepto afetado e os possíveis prognósticos para a criança.

Considerando as inovações das técnicas diagnósticas, formas de prevenção e tratamento da DTS, o presente artigo tem como objetivo uma revisão bibliográfica atual a respeito dos dados epidemiológicos, da fisiopatologia, do diagnóstico, do tratamento e, principalmente, sobre os aspectos genéticos da DTS.

HISTÓRICO

Em 1881 Warren Tay, oftalmologista britânico, foi o primeiro a perceber as características clínicas da “amaurose infantil idiopática” ao observar pontos vermelho-cereja na retina de uma criança de um ano de idade com retardo físico e mental^{1,2,3}. Bernard Sachs, neurologista americano, em 1896, estabeleceu o termo *amaurose familiar idiopática*, após notar uma distensão citoplasmática neuronal, e reconheceu sua prevalência em Judeus. A compreensão da doença de Tay-Sachs, como ficou conhecida, teve que esperar pelo desenvolvimento de análises químicas, bioquímicas e histoquímicas. Isso perdurou até 1930 quando o bioquímico alemão Ernst Klenk identificou o material depositado no cérebro de pacientes com amaurose idiopática como um novo grupo de glicosfingolipídios ácidos e nomeou-os como “gangliosídeos”, porque eram achados em grande quantidade nas células ganglionares normais¹.

O principal composto armazenado nos neurônios é o gangliosídeo G_{M2}, o qual foi identificado por Svennerholm em 1962^{1,2}. Esta estrutura foi elucidada por Makita e Yamakama e confirmada por Ledeen e Salsman¹.

Os níveis de hexosaminidase nos pacientes com Tay-Sachs estavam sempre próximos do normal ou levemente elevados, pois até então, ainda não eram conhecidas as

duas formas da hexosaminidase e suas propriedades. Na verdade, eram os valores da Hex B que estavam elevados e mascaravam a deficiência de Hex A³. Em 1968, Robinson e Stirling, através da técnica da eletroforese, constataram que a hexosaminidase esplênica humana poderia ser separada em duas formas, uma ácida, termolábil – hexosaminidase A e uma básica, termoestável – hexosaminidase B³. Assim, em 1969, Okada, O'Brien e Sandhoff demonstraram que a atividade de um componente da hexosaminidase A era ausente em pacientes judeus com a doença de Tay-Sachs. Esses achados logo levaram a um diagnóstico bioquímico da doença, ao *screening* de portadores e ao diagnóstico pré-natal em gestações de risco^{1,2,4}.

O termo G_{M2} gangliosidose foi introduzido por Suzuki e Chen para as desordens caracterizadas pelo acúmulo primário de gangliosídeo G_{M2} resultante do bloqueio do seu catabolismo¹.

O período corrente da investigação foi estimulado pela purificação das hexosaminidases, pela descrição do metabolismo através de experimentos em culturas de fibroblastos e pela clonagem de cDNA e de genes; seguidos por estudos similares com a proteína ativadora de G_{M2}, cDNA e genes. O conhecimento da proteína primária e das estruturas gênicas proporcionou o entendimento detalhado da biossíntese e do processo subcelular das hexosaminidases e do ativador do G_{M2}, abrindo caminho para a definição das gangliosidose G_{M2} em termos moleculares¹.

EPIDEMIOLOGIA

A doença de Tay-Sachs (DTS), que exibe um padrão de herança autossômico recessivo, é especialmente prevalente entre os judeus – particularmente do leste da Europa (judeus Ashkenazi)^{1,5}.

A incidência da DTS é de aproximadamente 1 em 3600 judeus Ashkenazi nascidos nos EUA, nesta a taxa de portadores para a DTS é de aproximadamente 1 em 30. Entre os judeus Sephardic e todos os não judeus a incidência da doença tem sido observada como sendo de aproximadamente 100 vezes menor, correspondendo, então, a uma menor frequência de portadores, ou seja, de aproximadamente 1 em 300^{5,6}.

A DTS tem sido observada em crianças de todas as etnias, raças e grupos religiosos. Certas populações que são geneticamente isoladas, como por exemplo, franco-canadenses do leste do Vale do Rio São Lourenço. Cajuns da Lousiana e os Amish da Pensilvânia têm sido descritos como portadores de mutações no gene HEXA, com frequências comparáveis ou mesmo maiores do que aquelas observadas nos judeus Ashkenazi⁶.

O aconselhamento genético de portadores identificados através de programas de *screening* e monitorização das gestações de alto risco tem reduzido a incidência da DTS na população dos judeus Ashkenazi da América do Norte em mais de 90%⁶.

A população de judeus brasileiros é estimada em 90 mil indivíduos, atualmente não há programas de *screening* para a DTS nesta população. Um estudo realizado no instituto de biociências da universidade de São Paulo concluiu que a frequência de portadores dessa doença no Brasil é similar a dos outros países onde o programa de *screening* para detecção de portadores tem obtido significativo decréscimo na incidência da doença. Portanto, segundo Rozenberg e Pereira, justifica o implemento do programa de *screening* para a população de judeus brasileiros⁷.

FISIOPATOLOGIA

1) Aspectos Bioquímicos

As gangliosidoses G_{M2} são um grupo de distúrbios herdados causados por excessivo acúmulo intralisossomal de gangliosídeos G_{M2} , como, por exemplo, na DTS, e glicolipídios relacionados, particularmente nas células neuronais¹.

O gangliosídeo G_{M2} é formado por uma ceramida, por moléculas de glicose, galactose, N-acetilgalactosamina e uma molécula de ácido N-acetilneuramínico⁸. Figura 1 (anexo).

Os gangliosídeos são os mais complexos glicoesfingolipídios⁸, sendo encontrados principalmente nas terminações nervosas e dendritos neuronais; as células gliais, como oligodendrócitos e astrócitos, também têm sua singular composição glicosídica. No cérebro adulto humano, pelo menos doze diferentes gangliosídios foram identificados, quatro dos quais (G_{M1} , G_{D1a} , G_{D1b} e G_{T1b}) representam 90% do total¹.

Apesar de suas funções fisiológicas permanecerem obscuras, gangliosídeos específicos foram implicados como sítios ligantes na superfície celular para toxinas bacterianas e vírus, como co-receptores hormonais para o hormônio tireotrófico, para os fatores de crescimento e para os interferons, e também na mobilidade celular. Experimentos recentes mostram que os gangliosídeos têm efeitos neurotogênicos e

neurotróficos, nos quais podem induzir diferenciações em algumas culturas neuronais primárias e linhagens de células neuroblastômicas. Gangliosídeos exógenos também facilitam a sobrevivência e reparo, *in vivo*, de neurônios danificados tanto no sistema nervoso central como no sistema nervoso periférico¹.

A síntese dos glicoesfingolípídios ocorre por adição seqüencial de monômeros glicosilados transferidos de açúcares-nucleotídeos (doadores) para a molécula aceptora. Esse processo ocorre no retículo endoplasmático (RE) e no complexo de Golgi⁸.

O gangliosídeo G_{M2} é degradado no compartimento lisossomal pela β -hexosaminidase A, a qual remove o terminal N-acetilgalactosamina. A hexosaminidase A não interage diretamente com o gangliosídeo G_{M2} ligado à membrana celular, é necessária a extração do glicolípido da membrana celular pelo G_{M2} ativador, o qual formará com o gangliosídeo o complexo G_{M2} ativador/ G_{M2} , que é hidrossolúvel, e é o substrato para a hidrólise realizada pela enzima¹. Figura 2 (anexo)

Existem duas isoenzimas da β -hexosaminidase: a Hex A, que possui duas subunidades, α e β ; e a Hex B, um homodímero da subunidade β . Somente a Hex A pode atuar sobre o complexo gangliosídeo G_{M2} / G_{M2} ativador. Os genes que codificam essas subunidades: gene HEXA, que codifica a subunidade α da Hex A; o gene HEXB, que codifica a subunidade β da Hex A e da Hex B; ou ainda o gene GM2A que codifica o G_{M2} ativador; podem sofrer mutações. Tais alterações gênicas acarretam deficiências ou defeitos enzimáticos que levam ao desenvolvimento de gangliosidoses do tipo G_{M2} ^{1,9}. O número de éxons e a localização das junções éxon-íntron nos genes HEXA e HEXB são bastante similares; ademais, as suas seqüências de cDNA codificam proteínas que são 60% idênticas. Dessa forma, demonstra-se que esses genes são oriundos de um gene ancestral

comum, e espera-se que as subunidades α e β tenham a mesma estrutura tridimensional. Essa hipótese é consistente com a habilidade de formar dímeros com especificidade similar a substratos, a partir de qualquer combinação das duas subunidades³.

Embora somente as formas diméricas da Hex sejam ativas, a existência de duas isoenzimas Hex indica que cada subunidade contém todos os elementos necessários para formar um sítio ativo. Os sítios ativos associados com ambas subunidades α e β hidrolizam muitos dos mesmos substratos naturais e artificiais como o MUG (4- metilumbeliferil 2-acetamido-2-deoxi- β -D-glicopiranosídeo).Entretanto somente a presença do sítio ativo associado com a subunidade α resulta na hidrólise eficiente dos substratos carregados negativamente como o gangliosídeo G_{M2} e o 4-MUGS (2-acetamido-2-deoxi- β -D-glicopiranosídeo-6-sulfato)³.

As hexosaminidases e o G_{M2} ativador são glicoproteínas sintetizadas no lúmen do retículo endoplasmático e processadas pelo complexo de Golgi. Elas são transportadas via receptor da manose 6-fosfato para o lisossomo, onde são processadas até a sua forma final “madura”¹.

Em uma deficiência herdada de uma enzima funcional, o catabolismo de seu substrato permanece incompleto, levando ao acúmulo de metabólitos insolúveis, parcialmente degradados, dentro do lisossomo. Abarrotadas de macromoléculas incompletamente digeridas, estas organelas tornam-se grandes e suficientemente numerosas para interferir no funcionamento normal das células, originando os chamados distúrbios do armazenamento lisossômico¹⁰.Figura 3 (anexo). Um desses distúrbios é a DTS, a qual apresenta uma deficiência ou defeito na subunidade α da hexosaminidase A,

levando ao depósito do gangliosídeo G_{M2} nas células neuronais, o que explica as manifestações neurológicas observadas nesse transtorno^{1,10}.

2) Aspectos Patológicos

De maneira geral, a patologia é bastante similar na DTS, na Doença de Sandhoff e na deficiência do G_{M2} ativador; exceto na Doença de Sandhoff há o evidente comprometimento visceral. A alteração celular mais pronunciada é a presença de neurônios distendidos por todo o sistema nervoso, com acúmulo maciço de material de armazenamento nos lisossomos¹.

Os achados patológicos na DTS caracterizam-se primariamente pelo entumescimento neuronal, constituído por lisossomos extremamente distendidos, repletos de gangliosídeos G_{M2} e secundariamente por glioses – a qual é a fonte provável da macrocefalia. O acúmulo do gangliosídeo G_{M2} ocorre principalmente nos neurônios do sistema nervoso central e sistema nervoso autônomo, bem como na retina – particularmente nas margens da mácula, surge, então, um ponto vermelho-cereja na mácula, representando a acentuação da cor normal da coróide macular contrastada com a palidez produzida pelas células ganglionares ingurgitadas no restante da retina. Apesar da hepatoesplenomegalia ausente, células carregadas de lipídios são identificáveis no fígado, baço e pulmões^{2,10}. Nos pacientes com a forma infantil da DTS o acúmulo gangliosídico pode representar até 12% do peso seco cerebral. Pacientes com a forma crônica apresentam menor acúmulo gangliosídico e esse, pode mesmo ser restrito a regiões cerebrais específicas como, por exemplo, o hipocampo, os núcleos do tronco cerebral e a medula espinhal⁶.

A microscopia eletrônica revela corpos citoplasmáticos membranosos (MCB), compostos de camadas concêntricas de membranas densas por todo citoplasma dos neurônios envolvidos¹. Apesar dos MCB estarem presentes na grande maioria dos casos, no estudo de Hunda et al., esse achado histopatológico não foi observado, tanto devido ao início tardio da doença nos casos relatados como pela escassez dos axônios envolvidos¹¹.

MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

As diferentes variantes da DTS, assim como outras formas de gangliosidoses G_{M2} , foram subclassificadas clinicamente de acordo com a idade de início dos sintomas em forma infantil, juvenil e adulta. Entretanto, a diferenciação entre as formas juvenil e adulta é geralmente difícil e até mesmo arbitrária, já que muitos pacientes com apresentação na idade adulta relatam sintomas desde a infância¹. Acentuada heterogeneidade fenotípica é encontrada mesmo nos membros de uma mesma família^{1,6,11}. Todavia, há relato de homogeneidade fenotípica entre todos os membros afetados de uma mesma família¹¹.

1) Forma Aguda ou Infantil da DTS:

Na forma aguda da DTS, as crianças afetadas são aparentemente normais ao nascimento. Os primeiros sinais da doença – geralmente apreciados em retrospecto – são uma moderada fraqueza motora que aparece entre os três e seis meses de idade em conjunto com as contrações mioclônicas e uma exagerada reação aos sons agudos (“startle reaction”)^{1,2,6}. Essa reação é caracterizada por uma súbita extensão das extremidades inferiores e superiores, semelhante aos componentes iniciais do reflexo de Moro normal¹.

Entre os sexto e o décimo mês de idade, a criança não consegue adquirir novas habilidades motoras ou, até mesmo, perde as habilidades previamente demonstradas^{6,12}; a

progressiva fraqueza e hipotonia associadas com um pobre controle da cabeça, dificuldade de engatinhar e sentar são geralmente os fatores que levam os pais a procurar atenção médica^{1,2}.

A acuidade visual diminuída e movimentos oculares não usuais estão associados com palidez excessiva da mácula perifoveal da retina com proeminência da *fóvea centralis*, a tão chamada mancha vermelho-cereja (“cherry-red spot”)^{1,2,6,12}, que imediatamente leva à possibilidade da DTS ou à outra doença neurodegenerativa de depósito. Apesar de não ser patognomônica das gangliosidoses G_{M2} infantis, esse achado é visto em virtualmente todos os pacientes com DTS infantil ou Doença de Sandhoff¹ e pode desaparecer com o tempo². Além dessas manifestações típicas, há relato de um caso com presença de ptose unilateral¹².

Após o oitavo mês, a progressão da doença é rápida. Este período se caracteriza pela diminuição dos movimentos voluntários espontâneos e a criança torna-se progressivamente menos responsiva aos pais e ao ambiente. A visão deteriora rapidamente^{1,6}, embora a habilidade para distinguir entre o claro e o escuro pode ser preservada¹.

Convulsões são comuns por volta do décimo segundo mês de vida^{1,6}, convulsões parciais sutis^{1,6,12} ou crises de ausência tipicamente tornam-se mais freqüentes e mais severas com o tempo. As mudanças eletroencefalográficas são relativamente moderadas até o primeiro ano de vida, a partir de então, mostram deterioração rapidamente progressiva até a morte^{1,6}.

Macrocefalia progressiva tipicamente inicia por volta do décimo oitavo mês de vida; resultante de gliose cerebral reativa, e dessa forma difere da hidrocefalia verdadeira com aumento ventricular¹.

Deterioração no segundo ano de vida, invariavelmente, leva à postura de decerebração, dificuldade em engolir, atividade convulsígena crescente e, finalmente, a um estado completamente não responsivo - estado vegetativo¹.

O óbito é usualmente causado por broncopneumonia^{1,6}, resultante de estase ou aspiração, juntamente com depressão do reflexo da tosse. Usualmente, crianças que sofrem de gangliosidoses G_{M2} infantis não sobrevivem além do quarto ano de vida, entretanto, é conhecido um caso de sobrevivência até o sexto ano de vida¹.

Esse curso agudo e mais agressivo deve-se a uma inexistente ou pequena atividade da enzima Hex A.

2) Forma subaguda ou Juvenil da DTS:

A forma subaguda da DTS é marcada pelo desenvolvimento de ataxia e incoordenação que ocorre entre os dois e os dez anos de idade. Regressão do desenvolvimento e demência, envolvendo particularmente a fala e as capacidades vitais e declínio da cognição são características proeminentes nessa variante. Além do progressivo retardo motor, o curso da doença é caracterizado pelo aumento da espasticidade e aparecimento de convulsões, principalmente no final da primeira década de vida. A perda da visão, nesta forma, ocorre mais tardiamente em comparação com a forma aguda, e a degeneração da mácula (“cherry-red spot”) não é freqüentemente encontrada. Ao invés disso, atrofia óptica e retinite pigmentosa podem ser vistas tardiamente com a progressão dessa forma¹.

Um estado vegetativo com rigidez de decerebração desenvolve-se entre o décimo e o décimo quinto ano de vida, seguido pela morte dentro de poucos anos, frequentemente devido a uma intercorrência infecciosa^{1,6}.

Em alguns casos, essa doença apresenta um curso particularmente agressivo, culminando com a morte entre os dois e os quatro anos de idade. Esse fenótipo da forma subaguda tem sido descrito em pacientes com mutação no gene HEXA ou no gene HEXB^{1,6}.

3) Forma Crônica ou Adulta da DTS:

A apresentação crônica da DTS é caracterizada por uma neurodegeneração progressiva lenta associada com baixos níveis de atividade residual da enzima Hex A. A idade de início varia desde a primeira infância até o final da primeira década. Os fenótipos descritos variam conforme o local, a intensidade e a extensão do comprometimento do sistema nervoso central; entretanto, em virtualmente todos os casos, há evidência de envolvimento amplo desse sistema, resultando em sobreposição entre os diferentes fenótipos.

Os primeiros sintomas podem variar desde fraqueza muscular até achados extrapiramidais e manifestações cerebelares alteradas, regressão psicomotora pode ser menos proeminente. Em alguns pacientes sinais extrapiramidais de distonia, coreoatetose, e ataxia podem ser evidentes. Em outros pacientes, sinais cerebelares de disartria, ataxia, descoordenação motora e anormalidades posturais desenvolvem-se entre dois e dez anos de idade, entretanto, fala e pensamento tendem a ser envolvidos tardiamente no curso da

doença. Essa apresentação clínica pode sugerir possíveis diagnósticos diferenciais: degeneração espinocerebelar, ataxia de Friedreich, ou esclerose lateral amiotrófica (ALS).

Pacientes com a forma adulta da doença tendem a mostrar fraqueza muscular, fasciculações, e disartria indistinguíveis da forma progressiva da atrofia espino-muscular¹³ de início na adolescência (Doença de Kugelberg-Welander) ou início precoce da ALS^{1,6}. Aproximadamente 40% dos pacientes têm manifestações psiquiátricas (sem demência)^{1,6,14} incluindo depressão psicótica recorrente, sintomas bipolares e esquizofrenia aguda com desorganização do pensamento, agitação, alucinações e paranóia^{1,6}

Esse curso lento das formas de início tardio da DTS é devido à presença de alguma atividade hidrolítica residual da enzima Hex A sobre o gangliosídeo GM₂.

ASPECTOS GENÉTICOS

1) Padrão de Herança

A DTS exibe um padrão de herança autossômica recessivo, pois se enquadra dentro dos critérios que definem essa herança¹⁵.

Entre os critérios para a herança autossômica recessiva podemos incluir: 1)um fenótipo autossômico recessivo, caso apareça em mais de um membro de uma família, é encontrado tipicamente apenas na irmandade do probando, não nos pais, filhos ou outros parentes; 2)o risco de recorrência para cada irmão do probando é de um em quatro; 3)para a maioria dos distúrbios autossômicos recessivos, ambos os sexos têm a mesma probabilidade de ser afetados; 4)os pais do indivíduo afetado em alguns casos são consangüíneos, isto é especialmente provável se o gene responsável pela afecção for raro na população; o que não pode ser aplicado à DTS na população do judeus Ashkenazi devido a presença do heterozigoto e pelo fato de comporem uma população “fechada”, facilitando o casamento entre esses heterozigotos, entretanto, na população em geral esse critério é válido¹⁵.

Diversamente dos distúrbios autossômicos dominantes, nos quais as pessoas afetadas geralmente são heterozigotas, os distúrbios autossômicos recessivos expressam-se

apenas em homozigotos, que, portanto devem ter herdado um alelo mutante de cada genitor. Heterozigotos para doenças autossômicas recessivas são completamente assintomáticos¹⁵.

2) Estrutura do Gene HEXA

O gene HEXA, identificado no cromossomo 15q23-q24⁴, é o responsável pela codificação da subunidade α da enzima Hex A¹. É formado por, aproximadamente, 26Kb⁶-35Kb³ e composto por 14 éxons e 13 íntrons⁶. Sua região promotora é rica em guanina e citosina e contém possíveis “TATA” e “CAAT Box”. O gene HEXA é transcrito em dois RNAm ambos os quais codificam o mesmo prepro- α -polipeptídeo³.

Vários alelos foram identificados no locus da subunidade α , cada um associado a um grau variável de deficiência enzimática e, portanto, com manifestações clínicas diversas¹⁰.

Como a seqüência primária de aminoácidos das cadeias α e β foram determinadas, tornou-se óbvio, mesmo para uma pequena quantidade de seqüências estabelecidas, que elas compartilham de um grande grau de estruturas primárias homólogas. A comparação das seqüências aproximadamente completas revelou um total de 57% de homologia. Da mesma forma, as estruturas dos genes HEXA (que codifica a subunidade α) e HEXB (que codifica a subunidade β) demonstraram um impressionante grau de homologia entre os números e a localização das junções éxon-íntron. Apesar do fato dos genes localizarem-se em diferentes cromossomos, sugere-se que os genes HEXA e HEXB são provenientes de um ancestral comum¹.

Uma importante implicação da estrutura das subunidades α e β é que áreas idênticas entre as estruturas primárias aderidas comumente coincidem com domínios funcionais comuns. Um resíduo conservado, α - arg178/ β -Arg211, demonstra ser necessário para manter a atividade catalítica das duas subunidades, sendo essa hipótese munida de um suporte experimental¹.

3) Mutações

Como é típico das doenças genéticas, muitas classes de mutações têm sido identificadas na DTS. No gene HEXA foram encontrados os seguintes tipos de mutações: a substituição de nucleotídeos - na qual ocorre a troca de um único nucleotídeo (mutação puntiforme) numa seqüência de DNA, podendo alterar o código de uma trinca de bases e levar à substituição de um aminoácido por outro no produto gênico. Tais mutações denominam-se mutações de sentido trocado (missense), pois especificam um aminoácido diferente. Outro tipo é a mutação sem sentido (nonsense), a qual gera um dos três códons de “parada”. Existem, ainda, as mutações da emenda (splicing) do RNAm; as que afetam as bases necessárias no sítio doador (limite éxon-íntron) ou aceitor (limite íntron- éxon) da emenda, interferindo na emenda normal do RNAm naquele sítio, e em alguns casos até abolindo-a¹⁵.

As mutações na DTS também podem ser causadas pela inserção ou pela deleção de um ou mais pares de bases. No caso de deleções ou inserções envolvendo apenas alguns pares de bases (pequenas deleções ou inserções), quando o número de bases envolvidas não é múltiplo de três, a mutação de uma seqüência codificadora altera a matriz de leitura da tradução a partir do ponto de mutação que resulta numa seqüência de aminoácidos

diferentes na extremidade carboxil da proteína codificadora – estas são as mutações por mudança na matriz de leitura, as quais também podem produzir códons de “parada” à jusante. Também foram identificadas na DTS grandes deleções, as quais apresentam grandes alterações da estrutura do gene¹⁵.

A tabela a seguir demonstra o número total de mutações conhecidas até o momento¹⁶.

Tipos de mutações	Número total de mutações
Substituições de nucleotídeos (missense/nonsense)	54
Substituições de nucleotídeos (splicing)	19
Pequenas deleções	13
Pequenas inserções	4
Grandes deleções	1
Total	91

Enquanto as mutações que causam a diminuição completa da atividade da enzima Hex A, ou seja, deleções parciais, originam a forma aguda da DTS, a qual é devastadora, acredita-se que mutações que permitem um nível residual de atividade da enzima Hex A originam a forma de início tardio da DTS e um curso menos agressivo. Assim pacientes com níveis muito reduzidos ou ausentes da Hex A terão um rápido acúmulo do gangliosídeo G_{M2} , assim apresentando manifestações clínicas mais precoces, enquanto os pacientes com níveis residuais dessa enzima terão um acúmulo mais lento do gangliosídeo, assim apresentando manifestações clínicas mais tardias. Um ensaio, no qual foram empregados a proteína G_{M2} ativador e o gangliosídeo G_{M2} como substratos, determinou a correlação entre a atividade residual da enzima Hex A e a severidade da

doença resultante. As atividades enzimáticas encontradas para as formas aguda, subaguda e crônica foram $\leq 0,1$; 0,5 e 2-4% do controle normal, respectivamente³.

Dois probandos clinicamente saudáveis com baixa atividade da Hex A foram identificados como possuindo uma atividade da enzima entre 11 e 20% . Isto sugere um *limiar crítico*, ou seja, o valor mínimo de atividade da Hex A necessário para manter uma taxa de hidrólise do GM2 maior que ou igual a taxa de transporte do gangliosídeo a ser incorporado no lisossomo, a qual na DTS deve ficar entre 5 e 10% da atividade normal da enzima Hex A³.

3.2) Mutações do Gene HEXA

Indivíduos com a forma aguda infantil têm dois alelos nulos sem atividade enzimática da Hex A, indivíduos com as formas juvenil e crônica são usualmente heterozigotos compostos para um alelo nulo e um alelo expressivo que resulta numa baixa atividade residual da Hex A em relação ao gangliosídeo GM₂⁶.

3.2.1) Associadas com a DTS Infantil

A maioria das mais de noventa mutações identificadas até agora como causadoras da DTS estão relacionadas com o fenótipo infantil. Todas as pequenas inserções ou deleções que produzem *frameshift*¹ (mutações por mudança da matriz de leitura)¹⁵ e substituições nucleotídicas que produzem códon de “parada” (nonsense) resultam nesse fenótipo, pois levam a formação de uma proteína truncada. A maioria das mutações da emenda (splicing) entra nessa categoria, mas há exceções importantes¹.

A primeira mutação identificada foi uma deleção de 7,6 Kb na extremidade 5' do gene HEXA em pacientes franco-canadenses. A deleção estende-se por aproximadamente 2 Kb à montante da extremidade 5' dentro do íntron 1. Imagina-se que isso tenha surgido de uma recombinação entre duas seqüências Alu (DNA repetitivo). Essa mutação resulta em um RNAm-negativo, ou seja que não pode ser transcrito¹.

Essa descoberta foi seguida pela identificação das duas mutações mais comuns na DTS infantil em judeus Ashkenazi. Myrowitz e Costigan, em 1988, demonstraram que a mutação mais freqüente nessa doença é a inserção de quatro pares de bases (4bp), + TATC₁₂₇₈, no éxon 11^{1,17}. Essa mutação cria um *frameshift* e um códon de “parada”, 9 nucleotídeos à jusante, nesse éxon, resultando numa deficiência de RNAm. O gene HEXA é transcrito normalmente e a expressão dessa mutação resulta na produção de um RNAm estável, mas na síntese de um α -polipeptídeo truncado. A segunda mutação mais freqüente é a substituição do primeiro nucleotídeo, guanina, do sítio doador da emenda (splicing junction mutation) do íntron 12, por citosina (G→C) o que resulta num RNAm instável, que, quando maduro, retém o íntron 12 ou exclui o éxon 12, ocasionando a formação de uma proteína truncada^{1,3,6}.

Muitas mutações missense descritas afetam a junção das subunidades enzimáticas ou o processamento do precursor α -polipeptídeo sintetizado. A maioria foi detectada na extremidade 3' da proteína, apesar de não haver evidência direta de uma seqüência ou estrutura próxima ao C-terminal envolvida especificamente com o transporte subcelular. Há dois grupos de proteínas mutantes. No primeiro grupo, o precursor α é retido no retículo endoplasmático, a proteína não é fosforilada, não se combinando com a subunidade β , não formando, dessa forma, a enzima Hex A, a qual deixa de ser secretada

e transportada para o lisossomo. Como exemplos temos as mutações G1444→A (no éxon 13) a qual resulta na substituição da lisina pela glutamina na posição 482 da molécula HEXA (Glu⁴⁸²Lis) e G1496→A (no éxon 13) a qual resulta na substituição da histidina pela arginina na posição 499 da molécula HEXA (Arg⁴⁹⁹His). A primeira leva a forma aguda da DTS e essa última foi descoberta em um paciente com a doença subaguda que era um heterozigoto composto com um segundo alelo funcionalmente nulo. No segundo grupo, o precursor α é fosforilado, mas não se associa com a subunidade β : a enzima, então, não é processada na forma madura. Como exemplos dessa mutação temos C1510→T (no éxon 13) a qual resulta em Arg⁵⁰⁴Cis, G1511→A (no éxon 13) a qual resulta em Arg⁵⁰⁴His e G805→A (no éxon 1) a qual resulta em Gli²⁶⁹Ser (encontrada em pacientes com doença crônica). Em pacientes homozigotos para a mutação Arg⁵⁰⁴, a severidade da expressão clínica varia de acordo com o aminoácido substituído. Um paciente homozigoto para a mutação Arg⁵⁰⁴Cis e o outro no qual essa mutação ocorreu juntamente com uma mutação no sítio doador, funcionalmente nula, apresentaram um fenótipo infantil. Por outro lado, um paciente homozigoto para a mutação Arg⁵⁰⁴His e outro com essa mutação ocorrendo juntamente com uma inserção + TATC₁₂₇₈ funcionalmente nula, apresentaram a doença subaguda^{1,2,13}.

As células apresentam um “sistema de controle de qualidade”, no qual ocorre a retenção de subunidade(s) não agrupadas de proteínas multiméricas, assim como de proteínas corretamente “folded”, no RE e no complexo de Golgi, sendo realizada através da interação com proteínas residentes nesses compartimentos, as quais também são normalmente recicladas, como exemplos temos as *chaperones*, como a GRP94; proteína isomerase dissulfídica, PDI; BiP; Erp72; ER60; calreticulina; e calnexina. Acredita-se que

essas proteínas também auxiliem monômeros normais (não mutados) em seu “folding”, enquanto que os monômeros mutados são retidos e têm sua degradação acelerada³.

A presença desse “sistema de controle de qualidade” no RE sugere que subunidades com mutações missense, mesmo aquelas associadas com o fenótipo mais severo, não necessariamente são incapazes de formar uma Hex A parcialmente funcional, pois isso pode ser prevenido pela afinidade aumentada dessas subunidades por uma ou mais *chaperones*³. O diferente grau de afinidade pelas *chaperones*, o qual é determinado pela nova estrutura formada pela mutação, levará às diferentes formas de manifestação da doença (aguda, subaguda e crônica).

A maioria das mutações da emenda produz um fenótipo bioquímico funcionalmente nulo e são associadas com a DTS infantil. Na maioria dos casos o nível de RNAm nas células é tão baixo que o RNA transcrito pode ser altamente instável ou não atingir o citoplasma, não havendo, então, a formação da proteína. Como exemplos temos a mutação G→C (+1 IVS-12), que significa a substituição de uma guanina por uma citosina no primeiro nucleotídeo do íntron 12 e a G→A (+1 IVS-9), que significa a substituição de uma guanina por uma adenosina no primeiro nucleotídeo do íntron 9^{1,4}.

Todas essas mutações levam ou a não formação da subunidade α ou a formação de uma subunidade α alterada, o que determina uma atividade muito pequena da enzima Hex A ou uma inatividade completa dessa enzima, levando a ao desenvolvimento da forma aguda da doença.

3.2.2) Associadas com a DTS Subaguda

Akli et al. relataram um paciente que apresentava doença de início tardio, o qual era homozigoto para a mutação silenciosa G570→A no último nucleotídeo do éxon 5 (Leu¹⁹⁰Leu). Essa mutação permite uma pequena produção de RNAm normal, o que possibilita uma atividade residual da enzima Hex A^{1,6}.

Duas mutações que afetam o processamento da cadeia α foram associadas com o fenótipo subagudo, são elas a G1496→A (éxon 13) que resulta em Arg⁴⁹⁹His e a G1511→A (éxon13) que resulta em Arg⁵⁰⁴His. A substituição mais conservativa da histidina (em comparação com a cisteína, que origina um fenótipo infantil) permite a algumas cadeias α mutantes tornarem-se fosforiladas, associarem-se a cadeias β e serem levadas ao lisossomo, o que também possibilita uma atividade residual da Hex A¹.

Assim, essa forma tardia e não tão severa da doença é explicada pela permanência de alguma atividade da Hex A¹.

3.2.3) Associadas com a Variante B1

Uma importante classe de mutações é representada pela “variante B1” da DTS. Indivíduos afetados por essa variante produzem Hex A ativa para o substrato sintético 4MUG, mas não para o substrato sintético 4MUGS ou para o gangliosídeo G_{M2}. Isso porque a atividade da enzima Hex A sobre o substrato 4MUG deve-se à subunidade β , que permanece ativa nessa variante, enquanto a subunidade α apresenta-se deficiente, provavelmente por uma mutação no sítio ativo dessa subunidade. Um exemplo dessa classe de mutações é a G533→A (éxon 5) que resulta em Arg¹⁷⁸His, a qual é muito comum em portugueses. Pacientes homozigotos para essa mutação apresentam fenótipo

subagudo, enquanto que aqueles que são heterozigotos apresentam um segundo alelo agudo associado, o que leva a um fenótipo mais severo. Outros exemplos são C532→T (éxon 5) que resulta em Arg¹⁷⁸Cis e a G533→T (éxon 5) a qual resulta em Arg¹⁷⁸Leu¹. Essas duas mutações acarretam fenótipos agudos mais severos. Essa severidade crescente é consistente com informações bioquímicas, as quais sugerem que níveis mais baixos da cadeia α poderiam formar heterodímeros (Hex A) e sair do RE. Esses dados estão correlacionados com o grau de conservatividade das substituições dos aminoácidos (Arg>His>Cis≥Leu)³.

Em outro estudo verificou-se que o indivíduo que é heterozigoto para um alelo não expressivo e um alelo causador da variante B1 tem o fenótipo juvenil. Já o indivíduo que é homozigoto para a mutação causadora da variante B1 possui o dobro da atividade enzimática em relação ao heterozigoto composto, e dessa forma apresenta o fenótipo crônico moderado⁶.

3.2.4) Associadas com a Forma Crônica

Até o presente momento, somente duas mutações responsáveis pela forma crônica da DTS foram identificadas. A mutação G805→A (éxon 7) a qual resulta em Gli²⁶⁹Ser^{1,18} mais a formação de uma emenda anormal, que ocorre com significativa frequência na população Ashkenazi, permite a síntese do precursor da cadeia α , mas o polipeptídeo mutante é instável e não se associando sempre à subunidade β . Assim, a atividade da Hex A resultante é variável, o que explica a heterogeneidade clínica mesmo dentro de uma mesma família^{1,3,6}.

A segunda mutação associada com o fenótipo crônico é a A590→C (éxon 6) que resulta em Lis¹⁹⁷Thr, a qual foi identificada num paciente cujo segundo alelo tinha uma mutação Arg⁴⁹⁹His^{1,4,6}.

Assim como na forma subaguda, essas mutações permitem uma atividade residual da Hex A levando a um fenótipo não tão agressivo e de início mais tardio.

3.2.5) Associadas com a Pseudodeficiência Hex A-Minus

A pseudodeficiência de Hex A é causada por uma ou duas mutações puntiformes que levam a atividade reduzida, mas variável da enzima sobre os substratos sintéticos (4MUG e 4MUGS), mas com atividade funcional sobre o gangliosídeo G_{M2}.

Triggs-Raine et al. rastrearam muitos casos de pseudodeficiência com mutações no gene HEXA e identificaram a mutação C739→T (éxon 7) que resulta em Arg²⁴⁷Trp em sete dos oito casos analisados. Todos eram heterozigotos compostos nos quais o alelo mutado era “acoplado” com outro alelo portador de uma inserção + TATC₁₂₇₈ ou de uma mutação da emenda +1 IVS-12. Recentemente foi identificada uma outra mutação, C745→T (éxon 7) que resulta em Arg²⁴⁹Trp¹.

A enzima Hex A codificada nessas mutações é totalmente funcional sobre o substrato endógeno e a atividade enzimática encontra-se acima do limiar crítico, ou seja, maior do que 5%, necessário para prevenir o acúmulo gangliosídico³.

4) Percentagens das mutações encontradas

Triggs-Raine et al. (1990) realizaram um rastreamento, comparando testes moleculares e ensaios enzimáticos para detectar portadores para a DTS entre judeus

Ashkenazi. Entre judeus Ashkenazi dos Estados Unidos e de Israel, as duas mutações associadas com a forma aguda infantil da doença estavam presentes em 90 a 95% de todos os alelos, a mutação Glu²⁶⁹Ser, associada com a forma crônica da doença foi encontrada em 3%, e a mutação para a pseudodeficiência (Arg²⁴⁷Trp) estava presentes em 2% . Na população geral não judaica, aproximadamente 35% dos alelos apresentavam duas mutações associadas com o fenótipo da doença aguda, e aproximadamente 5% dos alelos apresentavam mutações associadas com as formas juvenil e crônica. Aproximadamente 35% dos heterozigotos não judeus, definidos enzimaticamente, são portadores de um dos dois alelos para a pseudodeficiência (Arg²⁴⁷Trp ou Arg²⁴⁹Trp)⁴.

A ORIGEM DAS MUTAÇÕES

Tem-se sugerido que a mutação inicial da DTS na população de judeus Ashkenazi ocorreu entre 70 d.c e 1100 d.c em áreas do centro-leste europeu^{1,4}. Previamente acreditava-se que a mutação tinha sido originada numa área mais ao norte. Como os judeus *Sephardic* e outros grupos não-Ashkenazi não portam o gene em frequência crescente, esse histórico parece ser apropriado¹.

Há muitos grupos pequenos nos quais a frequência de certos genes recessivos raros é bem diferente daquela na população em geral. Tais grupos são denominados *isolados genéticos*. Quando um caráter recessivo tem alta frequência numa determinada população, a consangüinidade geralmente não é uma característica marcante. Em conseqüência, entre judeus Ashkenazi, os pais de crianças afetadas não costumam ser consangüíneos, ao passo que nas outras populações cuja frequência de portadores é muito baixa, a taxa de consangüinidade nos genitores dos pacientes com DTS é alta^{4,15}

Duas explicações têm sido propostas para esclarecer a origem das mutações na DTS. Uma delas é o efeito do fundador¹ o qual ocorre se um dos fundadores de uma nova população (subpopulação pequena por isolamento de uma população maior) possuir um alelo relativamente raro, esse alelo pode tornar-se fixo no novo grupo com uma frequência relativamente alta¹⁵. A outra explicação é o fator de seletividade ambiental que confere

vantagem biológica aos heterozigotos. Os homozigotos, por serem mais afetados pela deficiência enzimática, apresentam maiores alterações nas membranas celulares, o que afeta os mecanismos de defesa. Dessa forma tornam-se mais suscetíveis a doenças, como por exemplo a tuberculose^{1,19}.

Fatores como a dieta, tratamento médico, diagnóstico pré-natal e interrupção seletiva da gravidez alteram o processo de seleção natural de um gene¹⁵.

DIAGNÓSTICO

Historicamente o diagnóstico deste grupo de desordens depende da história clínica, dos achados físicos, assim como das determinações histopatológicas ou bioquímicas derivadas de amostras de biópsia ou de espécimes *posmortem*¹. Entretanto, o emprego de novas técnicas como os ensaios enzimáticos e o diagnóstico molecular proporcionam um diagnóstico específico do indivíduo investigado.

1) Ensaio enzimáticos

O diagnóstico de defeitos na subunidade α causados por mutações no gene HEXA requer a demonstração específica da deficiência de atividade da enzima Hex A na presença de uma atividade normal ou mesmo elevada da Hex B^{1,6}.

Isso pode ser realizado através da separação das enzimas Hex A e Hex B pelo uso de substratos artificiais cromogênicos ou fluorogênicos que são hidrolizados por ambas as enzimas. Alternativamente, pode-se utilizar um substrato especificamente hidrolizado pela Hex A. Essas enzimas são usualmente separadas por cromatografia¹ ou por eletroforese^{1,20}. Enquanto a eletroforese permite somente um ensaio qualitativo, as outras técnicas permitem uma determinação quantitativa de cada enzima¹.

Os programas de rastreamento utilizam métodos enzimáticos baseados na baixa estabilidade térmica e no pH da Hex A. No pH 4,4 a Hex B é estável até 55° C, entretanto a Hex A é inativada com uma meia-vida de 10 minutos, na temperatura de 50° C, e de 3 minutos em 55°C. A atividade total é mensurada antes e depois da desnaturação seletiva da Hex A e a atividade das enzimas é calculada pela diferença entre essas medidas¹.

O substrato sintético 4MUGS é hidrolizado quase exclusivamente pela Hex A esse substrato provou ser útil no diagnóstico da DTS, particularmente na variante B1. Infelizmente, os ensaios com esse substrato não fazem a distinção dos heterozigotos para os alelos responsáveis pela pseudodeficiência, nem são tão sensíveis como os substratos - padrões utilizados para a detecção dos portadores de outras mutações na subunidade α . O método mais específico para a determinação da atividade da enzima Hex A emprega o substrato natural, gangliosídeo G_{M2} , na presença da proteína ativadora. Esse substrato é útil para o diagnóstico pré-natal da variante B1 ou para diferenciação entre as variantes infantil e crônica¹.

2) Diagnóstico Molecular

O diagnóstico molecular da deficiência da Hex A é baseado na análise de DNA para identificar mutações específicas no gene HEXA causadoras da DTS. Essa abordagem diagnóstica é proposta especialmente no aconselhamento genético, a fim de distinguir alelos causadores da pseudodeficiência de alelos causadores da doença em si, e especificar quais são os alelos causadores da doença em indivíduos afetados⁶.

Embora mais de 90 mutações tenham sido identificadas no gene HEXA¹⁶, somente as seis mais frequentes são utilizadas como parâmetro para as análises do DNA.

O painel abaixo ilustra as seis mutações mais frequentes, que compreendem: 1) três alelos nulos os quais em homozigose ou heterozigose composta estão associados com a DTS na forma aguda; 2) o alelo Gli269Ser, associado com a forma de início tardio da doença em homozigose ou heterozigose composta; e 3) dois alelos para pseudodeficiência, que não estão associados com a doença neurológica⁶.

Teste utilizando o diagnóstico molecular na detecção da deficiência da hexosaminidase A .

% de Heterozigotos				Alelo	Condição do Alelo
Obrigatórios ¹		Rastreamento ²			
Judeus	Não judeus	Judeus	Não judeus		
81%	32%	80%	8%	+TAC1278	Nulo
15%	0	9%	0	+1 IVS 12	Nulo
0	14%	0	10% ³	+1 IVS 9	Nulo
2%	0	3%	5%	Gly269Ser	Forma tardia da doença
0	0	2%	32%	Arg247Trp	Pseudodeficiência
0	0	0	4%	Arg249Trp	Pseudodeficiência
98%	46%	91%	23%	% de alelos causadores da doença detectados através do painel das seis mutações do gene HEXA.	

Fonte: [Kaback et al 1993](#)

1. heterozigotos obrigatórios, isto é, parentes de alguma criança com deficiência da hexosaminidase A.
2. Indivíduos identificados por programas de rastreamento os quais possuíam níveis de hexosaminidase A semelhantes aos níveis apresentados pelos heterozigotos.
3. primariamente pessoas de ascendência celta, francesa, cajun e holandesa da Pensilvânia

A análise do DNA é realizada através do uso de enzimas de restrição, *Southern blotting* e das técnicas de PCR (polimerase chain reaction)^{21,22}. Outro método utilizado para o diagnóstico da DTS é o MALDI-MS (matrix-assisted laser desorption/ionization

mass spectrometry) o qual requer a realização da amplificação do sítio de mutação seguido pela ação das enzimas de restrição. Em comparação com a eletroforese, o MALDI-MS obtém as mesmas informações, porém com maior rapidez²³.

3) Programas de Rastreamento

A Doença de Tay-Sachs foi a primeira condição genética para a qual um programa de rastreamento de heterozigotos baseado na comunidade foi instituído com a intenção de reduzir a incidência desse distúrbio²².

A elucidação da fisiopatologia da DTS levou ao desenvolvimento de métodos simples, precisos e economicamente viáveis para a identificação de heterozigotos. Esses indivíduos, portadores de mutações para a DTS, geralmente são assintomáticos, havendo assim, o risco de transmissão do gene alterado para a sua prole. Adicionalmente, devido a predileção étnica da DTS e a disponibilidade do aconselhamento genético e do diagnóstico pré-natal, estabeleceu-se um motivo para a implementação de um rastreamento populacional entre judeus em idade reprodutiva^{1,6}.

A análise da atividade enzimática a partir de amostras do soro²⁴ (por fracionamento através da temperatura ou do pH)¹ foi o método de escolha para programas de rastreamento da DTS por inúmeras razões: é econômica, pode ser feita em larga escala e pode-se utilizar amostras congeladas. Entretanto, a gravidez, o diabetes e o uso de medicamentos podem alterar os resultados²⁴.

Os métodos que utilizam plaquetas e leucócitos são mais confiáveis²⁴ por não sofrerem as mesmas alterações que as análises do soro¹. Contudo requerem amostras

frescas, só podem ser processados em um curto espaço de tempo, são mais caros e exigem uma técnica mais elaborada²⁴.

O maior problema dos ensaios enzimáticos é a sobreposição nas distribuições da atividade enzimática entre portadores e não-portadores, o que origina resultados falso-positivos e falso-negativos. A solução para esse problema é a classificação dos resultados encontrados nessa região de sobreposição como inconclusivos, o que requer testes adicionais (que levam a um aumento de custo e da ansiedade do indivíduo submetido a testagem)²⁴.

Um estudo recente (2001) realizado a partir de um programa de rastreamento em judeus Ashkenazi ortodoxos nos Estados Unidos, deu preferência à utilização da análise de DNA como único método de rastreamento. Esse mesmo estudo afirma que a análise de DNA, como método único, em comparação com outros métodos (ensaios enzimáticos ou a combinação de ensaios enzimáticos com análise de DNA) é muito mais barata e efetiva, já que é altamente específica e sensível²⁴.

O rastreamento de rotina através de ensaios enzimáticos não pode ser usado para distinguir as diferentes mutações do gene HEXA. Para o rastreamento inicial da população os testes enzimáticos identificam a maioria das mutações genotípicas, enquanto os testes de DNA são limitados pela a sua especificidade singular para cada mutação. Mesmo com a definição da anormalidade enzimática, a análise das mutações em todos os portadores e casais portadores é essencial e decisivo para definir a forma da DTS para a qual a prole do casal teria risco – infantil, subaguda ou crônica. Mais particularmente, se os pais aparentemente heterozigotos, na verdade têm um alelo para a pseudodeficiência, não havendo risco, então, de condições neurologicamente significativas na sua prole: o

feto heterozigoto composto poderia ser enzimaticamente deficiente, mas poderia não ter o desenvolvimento de manifestações neurológicas¹.

Em 1992 foi realizado, mundialmente, um amplo *screening*, no qual mais de 950 mil adultos jovens foram voluntários para determinar o índice de portadores do gene para DTS. Foram identificados mais de 36 mil heterozigotos e aproximadamente 1100 casais de risco (ambos os pais portadores do gene). Nenhum desses casais teve previamente uma criança com DTS ou outra gangliosidose G_{M2}. Esses resultados são apresentados na tabela a seguir^{1,19}.

País	Nº de pacientes testados	Portadores do gene	Casais de risco
EUA	712.818	27.150	657
Israel	159.544	4.229	263
Canadá	55.922	2.922	57
África do Sul	11.638	1.286	36
Europa	10.927	725	21
Brasil, México	1.682	96	20
Austrália	473	10	2
Total	953.004	36.418	1.056

4) Diagnóstico Pré-Natal

O rápido progresso das descobertas genéticas tem aumentado dramaticamente a capacidade diagnóstica para o rastreamento de portadores e o diagnóstico pré-natal das doenças genéticas²⁵. A Doença de Tay-Sachs foi um dos primeiros distúrbios metabólicos submetidos ao diagnóstico pré-natal¹.

Inicialmente os testes pré-natais eram empregados somente para casais, os quais já possuíam filhos portadores da doença. Mais recentemente, a maioria das gestações monitoradas envolvem casais identificados como de risco.

A quantificação das enzimas Hex A e Hex B pode ser feita através dos tecidos fetais na primeira metade da gestação. O material pode ser obtido através do líquido amniótico, cultura de células desse líquido, e das vilosidades coriônicas ou de derivados da cultura desse material¹.

As técnicas diagnósticas baseadas na análise molecular do DNA apresentam maior especificidade na detecção pré-natal da DTS. Quando uma mutação específica é detectada em cada progenitor, a identificação de homozigose ou heterozigose composta é feita sem dificuldades no feto; quando as mutações não são conhecidas ou não foram identificadas deve-se fazer testes enzimáticos combinados com análises de mutações específicas para excluir alelos para a pseudodeficiência em heterozigotos compostos¹.

Os testes pré-natais são realizados quando:

- O ensaio enzimático da enzima Hex A demonstrar que ambos os pais são heterozigotos e quando no teste molecular for demonstrada a presença de alelo para pseudodeficiência em um dos pais. Para a maioria dos casais, o teste pré-natal pode ser realizado por ensaio da atividade enzimática da Hex A em células fetais obtidas por amostragem das vilosidades coriônicas aproximadamente na 10^a-12^a semanas de gestação ou por amniocentese entre a 16^a-18^a semanas de gestação. Se as mutações causadoras da doença forem identificadas em ambos os pais, o teste pré-natal pode ser realizado por análise das mutações do gene HEXA obtido do DNA do feto por vilosidades coriônicas ou por amniocentese.

- Um dos pais é sabidamente heterozigoto e o outro tem uma atividade enzimática inconclusiva e a mutação causadora da doença não foi identificada na análise do DNA.
- A mãe é heterozigota e o genótipo paterno não é conhecido⁶.

Um estudo realizado, mundialmente, em Junho de 1992, num total de 2416 gestantes com risco aumentado para o desenvolvimento da DTS na sua prole foram monitoradas por amniocentese ou por biópsia de vilosidades coriônicas. Os resultados desse estudo são apresentados na tabela abaixo¹⁹.

Diagnóstico	Identificação de casais de alto risco		Total
	Pela prole prévia	Pelo screening de portadores	
Gestações Monitoradas	1118	1298	2416
Conceptos Afetados com DTS	268	201	469
Abortos eletivos	250	201	451*
Abortos Espontâneos Com DTS	3	2	5
Nascidos não Afetados	827	1054	1881

* dezoito crianças com a forma aguda da DTS como predito.

Cada gestação de um casal heterozigoto tem 25% de chance de gerar uma criança afetada, 50% de chance de gerar uma criança normal portadora do gene para a DTS e 25% de chance de gerar uma criança normal não portadora. Um casal que possui um filho afetado, mantém a chance de 25% de gerar outra criança afetada. A irmandade de um heterozigoto tem 50% de chance de ser heterozigota, já a irmandade não afetada de um indivíduo afetado têm 2/3 de chance de serem heterozigotos. Indivíduos heterozigotos para o alelo da pseudodeficiência não possuem risco aumentado de gerar uma criança com DTS ou algum outro tipo de deficiência da enzima Hex A⁶.

Entretanto, como demonstra a tabela, a frequência da DTS em fetos é significativamente menor do que os 25% esperado. Isso é explicado pelo significativo número de gestações monitoradas, nas quais risco verdadeiro era menor do que 25% ou era insignificante, ou seja, algumas gestações monitoradas apresentam um ou ambos os progenitores com testes de rastreamento inconclusivos^{1,19}.

O aconselhamento genético é uma alternativa que proporciona à população informações sobre a natureza, hereditariedade e implicações da doença. Uma vez identificados, os casais de risco podem recorrer ao aconselhamento genético, que inclui a opção do monitoramento pré-natal. Assim, esses casais têm maiores condições de escolher entre levar a gestação a termo ou interrompê-la – quando legalmente permitido- e até mesmo, optar pelo conhecimento ou não da doença em sua prole^{6,19}.

Esses casais também possuem como alternativa a escolha entre: ter sua própria prole ou adotar uma criança ou conceber através de inseminação artificial através de um gameta doado¹⁹, ou ainda optar pelo diagnóstico de pré-implantação, no qual o zigoto fecundado *in vitro*, quando blasto, é biopsiado, sendo posteriormente analisado pela técnica do PCR a fim de identificar o pré-embrião como normal, homozigoto ou heterozigoto para a DTS. Este método tem um custo bastante elevado, além do que os pais devem estar cientes de que se trata de um método complexo e de que há riscos de um diagnóstico errôneo^{21,26,27}.

O rastreamento de portadores de mutações para a DTS, o aconselhamento genético e a monitorização das gestações de risco têm reduzido a incidência da DTS na população de judeus Ashkenazi dos Estados Unidos e Canadá em 90%^{1,24,28}.

TRATAMENTO

O tratamento para a DTS é inespecífico, restringindo-se ao tratamento suporte das manifestações clínicas e manejo adequado das intercorrências, como por exemplo, a manutenção adequada da nutrição e da hidratação, manejo das doenças infecciosas e controle das convulsões quando e se elas ocorrerem. No entanto, diversas técnicas têm sido desenvolvidas no intuito de encontrar alguma terapia viável e realmente efetiva, assim como: a reposição enzimática, a privação do substrato, o transplante de medula óssea, a terapia gênica mediada por vetor retroviral e a liberação de genes diretamente no sistema nervoso central^{1,29}.

1) Reposição Enzimática

Essa terapia parece ser uma abordagem lógica no tratamento da DTS. Requer que uma quantidade significativa da Hex A alcance o sistema nervoso central (SNC) na forma catalítica ativa e que as células defeituosas possam liberar o material de armazenamento em excesso. A base dessa abordagem é o estudo *in vitro* de Brooks, no qual demonstrou-se que células cerebelares de um conceito afetado pela doença incorporavam a Hex A exógena e eram capazes de mobilizar o acúmulo de G_{M2} . Contudo, *in vivo*, essa abordagem não possui valor terapêutico. Isso porque a barreira hematoencefálica não

permite a penetração de quantidades suficientes de enzima no SNC, e também porque a enzima é metabolizada no fígado após a administração endovenosa (o que diminui a sua biodisponibilidade)²⁹.

2) Privação de Substrato

Esse método utiliza um inibidor específico da biossíntese do glicolípido, para reduzir parcialmente a quantidade de glicolípido sintetizada pelas células. Isso permite que o glicolípido ainda sintetizado seja catabolizado através da atividade residual da enzima. Essa abordagem funciona muito bem em modelos animais, prevenindo o acúmulo de gangliosídeo no SNC. Entretanto, em humanos, ainda não se tem certeza a respeito dos resultados pois esses devem ser verificados em ensaios clínicos^{29,30}.

3) Transplante de medula óssea

Essa abordagem é baseada na transferência de células hematopoiéticas normais doadoras para células hospedeiras defeituosas, após o transplante. Há evidências consideráveis de que o transplante em pacientes com doenças do armazenamento lipídico corrija o defeito enzimático no fígado e outros tecidos afetados. Todavia, nas doenças que afetam o SNC, como a DTS, questiona-se o uso dessa terapia pelo fato de a barreira hematoencefálica excluir a enzima circulante²⁹.

4) Terapia gênica mediada por vetor retroviral

Os sistemas de liberação de genes para células proliferativas são baseados nos vetores retrovirais recombinantes; os quais permitem uma integração estável dos genes

terapêuticos com o DNA das células hospedeiras e, à longo prazo, a expressão do gene transferido, sem gerar uma resposta imune contra os agentes virais²⁹.

Devido ao fato desses vetores não infectarem células estáveis, como o neurônio, essa técnica não apresenta validade terapêutica na DTS, embora seja empregada em outras gangliosidoses G_{M2} ²⁹.

5) Liberação de genes diretamente no SNC

Essa abordagem tem sido utilizada em diversos modelos animais como tentativa de superar o problema da barreira hematoencefálica existente em outras técnicas. Essa abordagem utiliza dois métodos: em deles é o uso de um vetor viral com tropismo pelo SNC como o herpes simplex vírus (HSV) ou o adenovírus (AV); o outro é o implante cerebral de células geneticamente modificadas que superexpressam o gene terapêutico. O HSV e o AV infelizmente não permitem uma expressão contínua do gene nas células hospedeiras, pois não se integram ao genoma. Também podem direcionar a liberação de genes para células não proliferativas como os neurônios.

Tem sido desenvolvido outro sistema que utiliza vetor viral é baseado no vírus da imunodeficiência humana (HIV), que já foi testado em injeções intracerebrais no estriado e hipocampo de ratos adultos²⁹.

Uma nova abordagem que promete grandes mudanças no tratamento das lesões amplas de SNC é o transplante de células neurais progenitoras multipotenciais que podem diferenciar-se em neurônios, astrócitos e oligodendrócitos. A vantagem dessa técnica é a possível correção, à longo prazo, dos distúrbios do armazenamento. Mas, são necessárias outras investigações a cerca dos resultados obtidos com o uso dessa técnica²⁹.

CONCLUSÃO

A DTS é o protótipo das desordens de armazenamento lisossomal de esfingolipídios. A natureza hereditária dessa doença, invariavelmente, neurodegenerativa fatal, sua predileção étnica (judeus Ashkenazi), os achados neuropatológicos característicos (“balonamento” de neurônios com maciço acúmulo de corpos membranosos citoplasmáticos), e a natureza e a estrutura do material intraneuronal estocado (gangliosídeo G_{M2}) são bem estabelecidos.

Devido ao fato dessa doença, na maioria das vezes, levar a uma deterioração mental e física intensa, culminando com a morte da criança afetada por volta dos quatro anos de idade, esforços foram aplicados com o intuito de diminuir a incidência dessa doença através do *screening* de portadores de genes causadores da DTS, diagnóstico pré-natal e programas de aconselhamento genético.

Estudos demonstraram que esses esforços têm surtido efeitos, pois a incidência da DTS em judeus Ashkenazi reduziu em 90% nos Estados Unidos e Canadá.

Como, ainda hoje, o tratamento para a DTS é inespecífico, restringindo-se ao tratamento de suporte e ao manejo adequado das intercorrências, tem-se buscado o

desenvolvimento de novas técnicas com o intuito de encontrar alguma terapia viável e realmente efetiva.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds). The metabolic and molecular bases of inherited disease, 7ª edição. Editora Mac Graw-Hill, 1995.
- 2) Emery AEH, Rimoin DL (eds). Principles and Practice of Medical Genetics, Volume II, 3ª edição. Edinburgh, London, Madrid, Melbourne, San Francisco, Tokyo, Editora Churchill Livingstone, 1996.
- 3) Mahuran DJ. Biochemical consequences of mutations causing the GM2 gangliosidosis. *Biochimica et Biophysica Acta* 1455, 105-138, 1999.
- 4) McKusick VA (ed). Mendelian inheritance in man – a catalog of human genes and genetic disorders, volume II, 11ª edição. London, The Johns Hopkins University Press, 1994.
- 5) Gelehrter TD, Collins FS, Ginsburg D (eds). Principles of Medical Genetics, 2ª edição. Baltimore, Williams & Wilkins, 1998.
- 6) www.geneclinics.com
- 7) Rozenberg R, Pereira LD. The frequency of Tay Sachs disease causing mutations in the Brazilian Jewish population justifies a carrier screening program. *São Paulo Medical Journal* 119(4):146-9, jul 2001.

- 8) Champe PC, Harvey RA. Bioquímica Ilustrada, 2ª edição. Porto Alegre Editora Artes Médicas, 1996.
- 9) Hama Y, Li YT, Journal Biology and Chemical 272(5): 2828-33, 1997. Li SC: Interaction of GM2 activator protein with glycosphingolipids.
- 10) Cotran RS, Kuman V, Robbins SL (eds). Patologia Estrutural e Funcional, 5ª edição. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1996.
- 11) Hunda E, Graua A, Fogela W et al: Progressive cerebellar ataxia, proximal neurogenic weakness and ocular motor disturbances: hexosaminidase A deficiency with late clinical onset in four siblings. Journal of the Neurological Sciences 145:25-31, 1997.
- 12) Devidayal, Marwaka RK, Singh P et al: Ptosis in late infantile Tay-Sachs disease. Indian Journal Pediatric 68(5): 463-5, 2001.
- 13) Navon R, Khosravi R, Melki J, et al: Juvenile-onset spinal muscular atrophy caused by compound heterozygosity for mutations in the HEXA gene. Ann Neurol 41(5):631-8, 1997.
- 14) Zelnik N, Khazanov V, Sheinkman A et al: Clinical manifestations of psychiatric patients who are carriers of Tay-Sachs disease. Possible role of psychotropic drugs. Neuropsychobiology 41(3): 127-31, 2000.
- 15) Thompson M: Genética Médica 5ª edição, 1997.
- 16) www.uwcm.ao.uk
- 17) Myerowitz R, Costigan FC: The major defect in Ashkenazi Jews with Tay-Sachs disease is an insertion in the gene for alpha-chain of beta-hexosaminidase. J Biol Chem 263(35):18587-9, 1988.
- 18) Navon R, Proia RL: The mutations in Ashkenazi Jews with adult GM₂ gangliosidosis, the adult form of Tay-Sachs disease. Science 243(4897):1471-4, 1989.

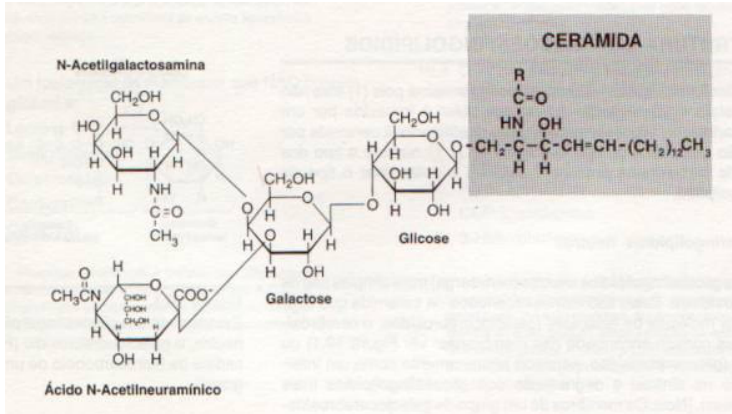
- 19) Kaback M, Lim-Steele J, Dabholkar D et al: Tay- Sachs Disease- Carrier Screening, Prenatal diagnosis, and the Molecular Era. *Jama* 270:2307-14, 1993.
- 20) Dreyfus JC, Poenaru L: Enzyme diagnostics in lysosomal diseases with emphasis on sphingolipidoses. *Arch fr Pediatr* 32(6):503-14, Jun-Jul, 1975.
- 21) Harper JC: Preimplantation diagnoses of inherited disease by embryo biopsy: an update of the world figures. *J Assist Reprot Genet* 13(2):90-5, Feb, 1996.
- 22) Ao A. Preimplantation genetic diagnosis of inherited disease. *Indian J Exp Biol.* 35(5):415.
- 23) Srinivasan JR, Liu YH, Venta PJ, et al. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry as a rapid screening method to detect mutations causing Tay-Sachs disease. *Rapid commun mass spectrom* , 11(10):1144-50, 1997.
- 24) Gideon B, Jerzy T, Neil R, et al. Tay-Sachs screening in the Jewish Ashkenazi population: DNA testing is the preferred procedure. *American Journal of Medical Genetics* 99:70-75, 2001.
- 25) Eng CE, Schechter C, Robinowitz J. et al. Prenatal Genetic carrier testing using triple disease screening *JAMA* 278, 1997.
- 26) Grifo JA, Tang YX, Munne S, Krey L: Update in preimplantation genetic diagnosis: successes, advances, and problems. *Advance genetic* 44:233-52, 2001.
- 27) Gibbons WE, Gitlin SA, Lanzerdorf SE, et al: Preimplantation genetic diagnosis for Tay-Sachs disease: successful pregnancy after pre-embryo biopsy and gene amplification by polymerase chain reaction. *American Society for Reproductive Medicine* 63(4):723-728, 1995.
- 28) Kaback MM. Population-based genetic screening for reproductive counseling: The Tay-Sachs disease model. *Eur J Pediatr* 159Suppl 3:S192-5, Dec 2000.

29)Chavany C and Jendobi M. Biology and Potential Strategies for the Treatment of GM2 gangliosidoses. *Molecular Medicin Today*, Vol 4, Issue 4 158-165, April 1998.

30)Platt FM, Jeyakumar M, Andersson U, et al. Inhibition of Substrate syntheses as a strategy for glycolipid lysosomal storage disease therapy. *J Inherit Metab Dis* 24(2):275-90, April 2001.

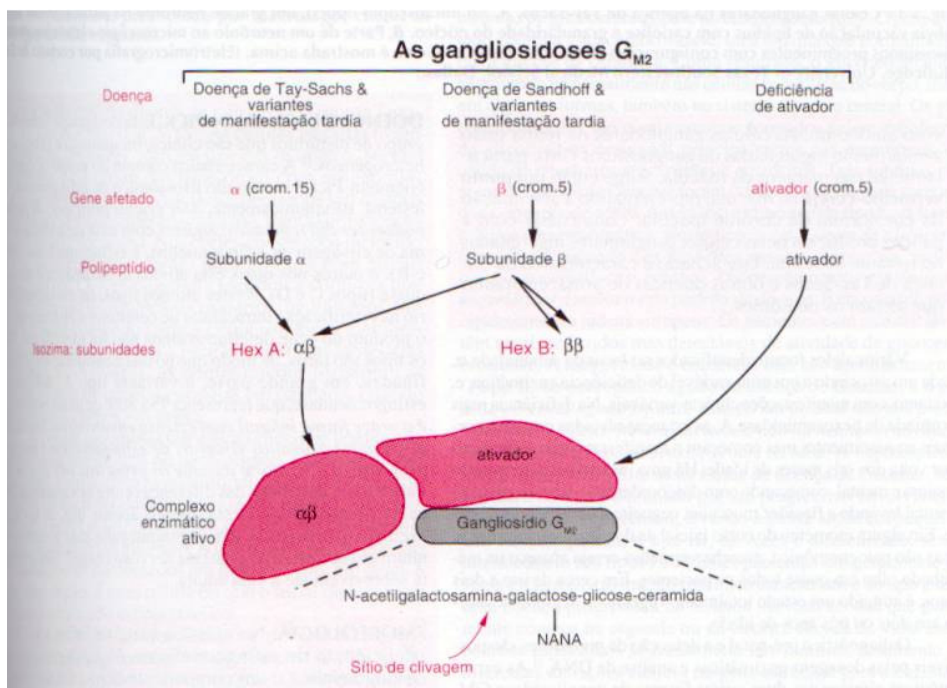
ANEXOS

FIGURA 1



* estrutura do gangliosídeo G_M

FIGURA 2



* sistema de três genes essenciais à atividade da hexosaminidase A e as doenças que resultam de defeitos em cada um dos genes.

FIGURA 3

