

**IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE
MUTACIONES EN EL GEN GAA EN PACIENTES COLOMBIANOS
AFECTADOS POR LA ENFERMEDAD DE POMPE**

MONICA YASMIN NIÑO MARTINEZ

**COLEGIO MAYOR DE NUESTRA SEÑORA DEL ROSARIO
ESCUELA DE MEDICINA Y CIENCIAS DE LA SALUD
MAESTRIA EN CIENCIAS HUMANAS CON ENFASIS EN GENETICA
HUMANA
BOGOTA, D.C.
2013**

**IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE
MUTACIONES EN EL GEN GAA EN PACIENTES COLOMBIANOS
AFECTADOS POR LA ENFERMEDAD DE POMPE**

MONICA YASMIN NIÑO MARTINEZ

**Trabajo de tesis para optar el título de
Magister en Ciencias con énfasis en Genética Humana**

Directoras:

**HEIDI ELIANA MATEUS, MD
DORA JANETH FONSECA MSc, PhD (a)**

**COLEGIO MAYOR DE NUESTRA SEÑORA DEL ROSARIO
ESCUELA DE MEDICINA Y CIENCIAS DE LA SALUD
MAESTRIA EN CIENCIAS HUMANAS CON ENFASIS EN GENETICA
HUMANA
BOGOTA, D.C.
2013**

COLEGIO MAYOR DE NUESTRA SEÑORA DEL ROSARIO
FACULTAD DE MEDICINA
IDENTIFICACION Y CARACTERIZACION FUNCIONAL DE
MUTACIONES EN EL GEN GAA EN PACIENTES COLOMBIANOS
AFECTADOS POR LA ENFERMEDAD DE POMPE

Línea de Investigación: Genética Humana

Instituciones Participantes: GENZYME Corporation; Departamento de Genética Clínica, Centro de Enfermedades Metabólicas y Lisosomales, Erasmus MC; Unidad de Genética, Facultad de Medicina, Colegio Mayor de Nuestra Señora del Rosario - Grupo GeniURos.

Tipo de Investigación: Postgrado

Tesista: Mónica Yasmín Niño Martínez.

Directores:

Dra. Heidi Eliana Mateus Arbeláez,

Dra. Dora Janeth Fonseca Mendoza

Nota de aceptación:

Sandra Ospina, MD, MSc

Jurado del trabajo de grado

Harvy Velasco, MD, Esp. en Genética

Jurado del trabajo de grado

Bogotá, Junio, 2013

“La Universidad del Rosario no se hace responsable de los conceptos emitidos por los investigadores en su trabajo, solo velara por el rigor científico, metodológico y ético del mismo en aras de la búsqueda de la verdad y la justicia”

Esta ardua labor se la dedico principalmente al ser que día a día me da la fuerza y motivación para continuar en este largo sendero que es la vida: Dios, al igual que a mi angelito que desde que se fue me cuida desde los cielos y quien estoy segura me ilumina y me protege con su manto sagrado: mi hermosa madre y por ultimo a mi viejo del alma, quien gracias a Dios aun me acompaña y me apoya en cada paso que doy.

AGRADECIMIENTOS

La investigadora da sus agradecimientos a GENZYME Corporation por su gran aporte, apoyo y credibilidad en el proyecto, ya que sin su colaboración no hubiese sido posible desarrollarse a cabalidad dicha investigación, de igual manera a las doctoras Dora Janeth Fonseca y Heidi Eliana Mateus, por sus grandes conocimientos y esfuerzos brindados al avance y culminación de tan maravilloso trabajo.

Adicionalmente un agradecimiento muy especial dirigido al Dr. Arnold J.J. Reuser y Marian Kroos por su gran aporte intelectual, interés, dedicación, asesoramiento a nivel de técnicas de laboratorio y fructíferas discusiones que hicieron posible de este trabajo un avance más en pro de la ciencia. Y a todos aquellos que hicieron posible, de una u otra manera, la realización de tan ardua labor.

Heidi Eliana Mateus Arbeláez, MD, MSc
Directora de Trabajo de Grado

Dora Janeth Fonseca Mendoza, Biol, MSc, PhD (a)
Directora de Trabajo de Grado

Sandra Ospina, MD, MSc
Jurado del trabajo de grado

Harvy Velasco, MD, Esp. En Genética
Jurado del trabajo de grado

Carlos Martin Restrepo, MD, PHD
Director del Departamento de Ciencias Básicas

Nora Constanza Contreras Bravo, Biol, MSc
Coordinador del Programa

CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	22
1. MARCO TEÓRICO	24
1.1 HISTORIA	24
1.2 EPIDEMIOLOGIA	25
1.3 BIOLOGÍA MOLECULAR DEL GEN ALPHA-GLUCOSIDASA ACIDA (GAA)	27
1.3.1 Localización cromosómica de GAA	27
1.3.2 Estructura del gen GAA	28
1.4 ALPHA GLUCOSIDASA ACIDA (GAA)	29
1.4.1 Descripción	29
1.4.2 Modificaciones post-transduccionales	30
1.4.3 Caracterización del sitio catalítico	34
1.5 ESTRUCTURA DE LA PROTEÍNA GAA	35
1.6 PATOLOGÍA	36
1.7 PRINCIPALES VÍAS METABÓLICAS DEL GLUCÓGENO EN MUSCULO	41
1.8 ASPECTOS CLÍNICOS DE LA ENFERMEDAD DE POMPE	42
1.8.1 Manifestaciones clínicas	42
1.8.2 Enfermedad de inicio infantil	44
1.8.3 Enfermedad de Pompe de inicio Tardío	51
1.9 HETEROGENEIDAD GENÉTICA Y CORRELACIÓN GENOTIPO-FENOTIPO	56
1.9.1 Rango de formato por severidad	60
1.10 MUTACIONES POR ORIGEN ÉTNICO	63
1.11 DIAGNÓSTICO	64
1.11.1 Diagnóstico Clínico	64
1.11.2 Test no específicos que soportan el diagnostico de Enfermedad de Pompe	65

1.11.3 Test usados para establecer el diagnostico de Enfermedad de Pompe	66
1.11.4 Estrategia del Test	73
1.12 TRATAMIENTO	73
1.12.1Terapia génica	75
1.12.2 Tratamiento nutricional	75
1.12.3 Terapia de remplazo enzimático (TRE)	77
1.13 MATERIAL INMUNOLÓGICO CON REACTIVIDAD CRUZADA (CRIM)	80
1.14 REGISTRO DE POMPE	82
2. JUSTIFICACIÓN	83
3. PLANTEAMIENTO Y FORMULACIÓN DEL PROBLEMA	85
4. OBJETIVOS	86
4.1 OBJETIVO GENERAL	86
4.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS	86
5. ASPECTOS METODOLÓGICOS	87
5.1 TIPO DE ESTUDIO	87
5.2 POBLACIÓN DE REFERENCIA Y MUESTRA	87
5.2.1 Criterios de inclusión	87
5.2.2 Criterios de exclusión	88
5.3 VARIABLES	88
5.4 TÉCNICAS DE RECOLECCIÓN DE LA INFORMACIÓN	88
6. MATERIALES Y MÉTODOS	90
6.1 PACIENTES	90
6.2 MEDICIÓN DE ACTIVIDAD DE ALFA GLUCOSIDASA ÁCIDA	90
6.3 EXTRACCIÓN DE ADN	91
6.4 DETECCIÓN DE MUTACIONES DEL GEN GAA	92
6.5ANÁLISIS DE SECUENCIACIÓN PARA LA IDENTIFICACIÓN DE MUTACIONES EN LA REGIÓN CODIFICANTE Y EN EL INTRON 1 DEL GEN GAA	92

6.6 CONDICIONES DE AMPLIFICACIÓN DE LA REGIÓN CODIFICANTE DEL GEN GAA	94
6.7 CONCENTRACIONES FINALES DE LOS REACTIVOS	94
6.8 SECUENCIACIÓN DE LOS EXONES DEL GEN GAA	94
6.8.1 Productos de PCR	95
6.8.2 Mezcla para el ciclo de secuencia	95
6.9 ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS	97
6.10 NOMENCLATURA DE LAS MUTACIONES	97
6.11 HERRAMIENTAS BIOINFORMÁTICAS	98
6.12 ANÁLISIS FUNCIONAL DE LAS VARIACIONES EN LA SECUENCIA DE GAA	100
6.13 DESCRIPCIÓN DE LA TÉCNICA MUTAGÉNESIS SITIO-DIRIGIDA	101
6.13.1 Diseño de los primers	101
6.13.2 Mutagenesis sitio-dirigida	105
6.13.3 Descripción de la técnica mutagénesis sitio-dirigida	106
6.14 ELECTROFORESIS EN SDS-PAGE	119
7. ASPECTOS ESTADÍSTICOS	121
8. ASPECTOS ÉTICOS	122
9. RESULTADOS	123
9.1 VARIABLES DEMOGRÁFICAS Y MEDICIÓN DE ACTIVIDAD DE ALFA GLUCOSIDASA ÁCIDA	123
9.2 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS PACIENTES COLOMBIANOS CON EP	124
9.3 DETECCIÓN DE LAS MUTACIONES EN EL GEN GAA	124
9.4 IDENTIFICACIÓN DE MUTACIONES NUEVAS	128
9.5 ANALISIS BIOINFORMATICO DE IMPACTO FUNCIONAL	130
9.5.1 Alineamiento múltiple	130
9.5.2 Predicción de efecto deletéreo	131
9.6 ANALISIS FUNCIONAL IN VITRO DE LAS MUTACIONES NUEVAS	133
9.7 EFECTO FUNCIONAL DE MUTACIONES	136

9.8 CORRELACION GENOTIPO/FENOTIPO	140
9.9 ANÁLISIS DE HAPLOTIPOS	143
10. DISCUSIÓN	145
10.1 MUTACIONES COMUNES EN LA POBLACIÓN A ESTUDIO	145
10.2 VARIACIONES DE LA SECUENCIA, SU EFECTO, Y CORRELACIÓN GENOTIPO-FENOTIPO	149
10.3 NUEVAS VARIANTES DE LA SECUENCIAGAA	153
10.4 VARIANTES DE LAS SECUENCIAS ADICIONALES	154
10.5 ORIGEN ÉTNICO DE LAS MUTACIONES ANALIZADAS	155
11. CONCLUSIONES	157
12. PERSPECTIVAS	158
REFERENCIAS	159
ANEXOS	179

LISTA DE CUADROS

	Pág.
Cuadro 1. Incidencia de la enfermedad de Pompe en diferentes poblaciones	26
Cuadro 2. Clasificación de la enfermedad de Pompe	43
Cuadro 3. Signos y Síntomas en la Enfermedad de Pompe de Inicio Infantil	45
Cuadro 4. Frecuencia de síntomas iniciales en la enfermedad de Pompe de inicio infantil	47
Cuadro 5. Diagnóstico diferencial Enfermedad de Pompe de Inicio Infantil	49
Cuadro 6. Signos y Síntomas en la Enfermedad de Pompe de Inicio tardío	52
Cuadro 7. Diagnóstico diferencial en la enfermedad de Pompe de inicio tardío	54
Cuadro 8. Heterogeneidad Genética y clínica en Enfermedad de Pompe	60
Cuadro 9. Rango de formato por severidad de las formas moleculares de GAA en medio y en células	62
Cuadro 10. Mutaciones comunes en determinados grupos étnicos en enfermedad de Pompe	64
Cuadro 11. Resumen del Test Genético Molecular usado en Enfermedad de Pompe	72
Cuadro 12. Variables incluidas en el análisis de pacientes colombianos con Enfermedad de Pompe	88
Cuadro 13. Secuencia de los primers de amplificación para la región codificante del gen GAA	93
Cuadro 14. Concentraciones finales de los reactivos	94
Cuadro 15. Mezcla para el ciclo de secuencia en ABI Prism310	95
Cuadro 16. Condiciones de la PCR de secuencia	96
Cuadro 17. Primers usados en mutagenesis sitio-dirigida	104
Cuadro 18. Reactivos y cantidades usadas en PCR después de Mutagenesis sitio-dirigida	113
Cuadro 19. Primers usados para la amplificación del gen GAA después de mutagenesis sitio-dirigida	114
Cuadro 20. Frecuencias alélicas y porcentajes de cada una de las mutaciones	125

Cuadro 21. Procedencia, subtipo de la enfermedad y genotipo de los pacientes Afectados	126
Cuadro 22. Efecto de las mutaciones encontradas en el estudio	127
Cuadro 23. Resumen de las predicciones usando herramientas bioinformáticas para las mutaciones p.Leu369Pro y C p.Trp746Arg	132
Cuadro 24. Variaciones en las secuencias analizadas por expresión in vitro	135
Cuadro 25. Curva de calibración a partir de absorbancias obtenidas de los diferentes constructos a partir de la medición enzimática de la proteína	137
Cuadro 26. Cálculos de la de la medición de la actividad enzimática de GAA en el medio (%) de los diferentes constructos analizados en este estudio	138
Cuadro 27. Cálculos de la medición enzimática de GAA en las células (%) de los diferentes constructos analizados en este estudio	139
Cuadro 28. Efecto funcional de las dos nuevas mutaciones y de las variantes en la posición p.Trp746	140
Cuadro 29. Genotipo y perfil clínico de los pacientes Colombianos con EP	141
Cuadro 30. Genotipo y variantes encontradas en los pacientes PD07, D08, PD09, PD10 y PD11	143
Cuadro 31. Haplotipos Colombianos más frecuentes asociados a c.-32-13T>G	144
Cuadro 32. Haplotipos colombianos más frecuentes asociados a p-Arg854X	144
Cuadro 33. Perfil clínico, genotipos y correlación genotipo-fenotipos encontrados en este estudio	150

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Incidencia de la enfermedad de Pompe en diferentes poblaciones	27
Figura 2. Localización cromosómica del gen alpha-glucosidasa acida (GAA)	28
Figura 3. Estructura genómica de GAA humana	29
Figura 4. Procesamiento de alpha glucosidasa humana (GAA)	31
Figura 5. Modelo de maduración de GAA	34
Figura 6. Estructura y modelo tridimensional de la proteína GAA	36
Figura 7. Degradación del glucógeno en el lisosoma por la alpha glucosidasa acida	37
Figura 8. Mecanismo Patológico de la enfermedad de Pompe	38
Figura 9. Imágenes de microscopia de contraste de fibras musculares	39
Figura 10. Principales vías metabólicas del glucógeno en musculo	42
Figura 11. Diagnóstico para enfermedad de Pompe de inicio Temprano	50
Figura 12. Diagnóstico para enfermedad de Pompe de inicio Tardío	55
Figura 13. Distribución de los diferentes tipos de mutaciones deletéreas encontradas en pacientes con GSDII	57
Figura 14. Tipos de mutaciones y sus efectos que producen enfermedad de Pompe	57
Figura 15. 452 variaciones de la secuencia de la Enfermedad de Pompe distribuidas por severidad y clase (%)	58
Figura 16. Rango de severidad y clasificación de las variantes	63
Figura 17. Especialistas involucrados en el tratamiento en la enfermedad de Pompe	74
Figura 18. Status de CRIM	81
Figura 19. Diseño de Primers para p.Leu369Pro	102
Figura 20. Diseño de primers para p.Trp746Arg	103
Figura 21. Diseño de primers para otras mutaciones que conducen a cambio de p.Trp746	104
Figura 22. Cromatograma que muestra éxito de la Mutagenesis sitio dirigida	111

Figura 23. Cromatograma que evidencia el éxito de la Mutagenesis sitio dirigida	112
Figura 24. Cromatograma que evidencia el éxito de la Mutagenesis sitio dirigida	112
Figura 25. Método de mutagenesis sitio dirigida	115
Figura 26. Descripción de la transfeccion en células HEK293	116
Figura 27. Descripción de la técnica western blot	120
Figura 28. Distribución Geográfica de la Enfermedad de Pompe en Colombia	123
Figura 29. Alineamiento de la Secuencia GAA en el paciente 1(P01)	128
Figura 30. Alineamiento de la Secuencia GAA en el paciente 11 (P11)	129
Figura 31. Alineamiento de la Secuencia GAA en el paciente 12 (P12)	129
Figura 32. Alineamiento múltiple usando CLUSTAL 2.1 de la nueva variante p.Leu369Pro	130
Figura 33. Alineamiento múltiple usando CLUSTAL 2.1 de la nueva variante p.Trp746Arg	130
Figura 34. Expresión Transitoria de mutantes GAA en células HEK293	134

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
Anexo A. Consentimiento informado	179
Anexo B. Mutagenesis <i>in vitro</i>	184
Anexo C. Recoleccion del medio y celulas, determinacion en 4MU y BCA, PAGE y blotting	185
Anexo D. Artículo publicado indexado en PubMed: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=(%22Jimd+reports%22%5BJournal%5D)+AND+Reuser%5BAuthor%5D	187

RESUMEN

La Enfermedad de Pompe (EP) es un desorden metabólico caracterizado por la deficiencia de alfa-glucosidasa acida (GAA), una enzima que cataliza la hidrolisis de las uniones glucosidicas α -1.4 y α -1,6 de glucógeno. Esta deficiencia resulta en acumulación de glucógeno en todos los tejidos, especialmente en musculo esquelético. Los pacientes con EP muestran un gran espectro de fenotipos con respecto a la edad de inicio, progresión de la enfermedad, severidad y tasa de progresión a muerte. El curso clínico de la enfermedad es principalmente determinado por la naturaleza de las variaciones genéticas de GAA que llevan a diferentes grados de deficiencia enzimática. Hasta la fecha alrededor de 400 distintas variaciones en la secuencia de GAA han sido descritas, y en algunos casos la correlación genotipo-fenotipo no es claramente evidente.

En este estudio se describe el primer análisis genético y clínico de pacientes colombianos con EP en 13 individuos afectados. La secuenciación directa del gen GAA, reveló ocho distintas mutaciones relacionadas con la etiología de EP incluyendo dos nuevas mutaciones missense c.1106T>C (p.Leu369Pro) y c.2236T >C (p. Trp746Arg). Estudios funcionales *in vitro* mostraron que los cambios estructurales conferidos por ambas mutaciones no inhiben la síntesis del precursor de GAA de 110 KD pero afectan el procesamiento y el transporte intra-celular de la proteína. Adicionalmente, el análisis de variantes previamente descritas localizadas en esta posición (p.746Gly, p.trp746Cys, p.Trp746Ser, p.Trp746X) reveló nuevos hallazgos sobre la base molecular de EP. Se reporta que la mutación p.Trp746Cyspreviamente descrita como un polimorfismo, al igual que como una mutación causal, en este estudio se demostró que p.Trp746Cys tiene un efecto potencialmente leve. El análisis de haplotipos argumenta en favor de un origen ancestral afro-americano y europeode estas mutaciones en la población colombiana. Este trabajo contribuye al conocimiento de la correlación genotipo-fenotipo en la EP, lo que se espera facilite y mejore la asesoría genética de los pacientes afectados y sus familias.

Palabras clave: Enfermedad de Pompe, Enfermedad de almacenamiento de glucógeno tipo II, alfa glucosidasa acida humana.

ABSTRACT

Pompe disease (PD) is a recessive metabolic disorder characterized by acid α -glucosidase (GAA) deficiency, an enzyme that catalyzes the hydrolysis of α -1,4 and α -1,6 glucosidic bonds of glycogen. This deficiency results in lysosomal accumulation of glycogen in all tissues, especially in skeletal muscles. PD patients display a large spectrum of phenotypes with regard the age of onset, the disease progression rate and the severity of symptoms. The clinical course of the disease is mainly determined by the nature of GAA genetic variations which lead to different degrees of enzyme deficiency. Up till now, close to 400 distinct GAA sequence variations have been described, and in some cases the genotype-phenotype correlation is not immediately evident.

In this study, we described the first clinical and genetic analysis of Colombian PD patients performed in 13 affected individuals. GAA open reading frame sequencing revealed 8 distinct mutations related to PD etiology including to novel missense mutations, c.1106T>C (p.Leu369Pro) and c.2236T>C (p.Trp746Arg). *In vitro* functional studies showed that the structural changes conferred by both mutations do not inhibit the synthesis of the 110 KD GAA precursor form but affect the processing and intracellular transport of GAA. In addition, analysis of previously described variants located at this position (p.Trp746Gly, p.Trp746Cys, p.Trp746Ser, p.Trp746X) revealed new insights in the molecular basis of PD. Notably, we found that p.Trp746Cys mutation, which was previously described as polymorphism as well as a causal mutation displays a mild deleterious effect. Interestingly and by chance, our study argues in favor of a remarkable Afro-American and European ancestry of the Colombian Population. Taken together our report provides valuable information on the PD genotype-phenotype correlation, which is expected to facilitate and improve genetic counseling of affected individuals and their families.

Keywords: Pompe disease, *GAA* gene, glycogenosis type II, acid maltase deficiency, Lysosomal storage disorder.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Pompe (EP) o enfermedad de almacenamiento de glucógeno tipo II (GSDII OMIM 232300) es un desorden autosómico recesivo causado por mutaciones en el gen alfa-glucosidasa ácida lisosomal (*GAA*, 17q25.2-q25.3, OMIM 606800), que se caracteriza por la deficiencia de la enzima α 1-4 glucosidasa ácida (*GAA*) (EC.3.2.1.20) llevando a la acumulación de glucógeno intra-lisosomal en todas las células del cuerpo, pero los efectos son más notables en músculos; principalmente esquelético y cardíaco (van der Ploeg, 2008). La enfermedad presenta un amplio espectro clínico que varía en la edad de inicio, el órgano involucrado, la severidad y la tasa de progresión, lo que permite clasificarla en EP infantil clásica, EP juvenil y EP de inicio tardío (Kishnani, 2006).

La cardiomiopatía hipertrófica es la característica clave de la enfermedad de Pompe infantil clásica (van der Ploeg, 2008), la cual puede aparecer en útero o en los primeros meses de vida, se asocia con hipotonía, debilidad muscular generalizada, movimientos pausados, dificultades de alimentación, trastornos del crecimiento, problemas respiratorios (dificultad respiratoria e infecciones vía aérea), pérdida auditiva y la muerte se produce usualmente durante el primer año de vida (van den Hout, 2003). La Enfermedad de Pompe de inicio tardío comprende todos los subtipos más leves, incluyendo la de inicio infantil tardío, juvenil y adulto. Se presenta clínicamente como una miopatía proximal lentamente progresiva, en la cual los problemas respiratorios son la principal causa de muerte. (Hagemans, 2005; Hirschhorn, 2001)

Actualmente se estima que la EP tiene una frecuencia global de 1:40.000 nacidos vivos (Martiniuk, 1998; Aulsems, 1999). La última actualización The Pompe Disease Mutation Database (25 de junio de 2012) a través de <http://www.pompecenter.nl/> reporta 452 variaciones en la secuencia del gen *GAA*. Entre esas, 135 son consideradas muy severas, 127 son consideradas como potencialmente menos

severas, 27 son menos severas, 20 potencialmente leves, 4 probablemente no patogénicas, 93 sugieren un efecto no patogénico y adicionalmente 46 son de efecto desconocido (www.pompecenter.nl; Oba-shingo, 2009; Kross M, 2008). Varias de estas mutaciones han sido comúnmente encontradas en ciertas poblaciones como en afro-americanos provenientes del norte de África, en asiáticos (China, Taiwán y Japón) y en caucásicos (Holanda). En Colombia, estos datos nunca antes han sido abordados, es por ello, que en este estudio se pretende analizar los genotipos de *GAA* en los pacientes afectados, caracterizar el tipo de mutaciones que ellos presentan y establecer sus frecuencias, para así, finalmente poderlas comparar con las reportadas en otras poblaciones, evaluar su origen ancestral; o por el contrario, reportar el hallazgo de mutaciones no descritas previamente en la literatura y mediante análisis funcionales caracterizar el efecto que producen sobre la función de la proteína. En su conjunto, todo esto contribuirá a correlacionar las manifestaciones clínica y la variación genética en pacientes colombianos afectados con la EP, lo que contribuirá al conocimiento de la fisiopatología de la enfermedad. Adicionalmente, el análisis de la correlación genotipo-fenotipo y el diagnóstico de portadores permitirán un mejor asesoramiento genético al paciente y su familia.

1. MARCO TEÓRICO

1.1 HISTORIA

También conocida como glucogénesis tipo II (GSDII) o deficiencia de maltasa ácida, es una rara, progresiva e incluso fatal enfermedad que afecta a infantes, niños y adultos, fue descrita por primera vez en 1932 por el medico patólogo Holandés J.C. Pompe, quien documento el caso de una niña de siete meses de edad que falleció por hipertrofia cardiaca, aunque el síndrome había sido descrito previamente, Pompe hizo la observación clínica de la acumulación masiva de glucógeno dentro de las vacuolas, tanto en el corazón, como en todos los tejidos examinados (Van, 2011). Sobre las dos siguientes décadas, manifestaciones clínicas adicionales de cardiomegalia idiopática asociada con almacenamiento de glucógeno fueron definidas, incluyendo debilidad muscular con marcada hipotonía, hepatomegalia, macroglosia y cardiomegalia severa, con muerte antes del primer año de vida.

En 1954, Cori determino el proceso del metabolismo catalítico del glucógeno, clasificando el desorden como enfermedad de almacenamiento de glucógeno tipo II (GSDII) reflejando la alteración metabólica del glucógeno en los pacientes afectados (Cori, 1954). Basadas en las investigaciones de Cori, Hers y colaboradores en 1963, se describió la base metabólica de la enfermedad vinculada al depósito de glucógeno y a la ausencia heredada de enzimas lisosomales (Hers, 1963). En este mismo año se logró la delineación de la vía metabólica normal del glucógeno, lo que permitió la clasificación de la enfermedad debido al metabolismo patológico del mismo (Hirschhorn, 2001). Al mismo tiempo de Duve en 1963 (De Duve, 1963) identifico y caracterizo un nuevo organelo, el lisosoma, como una vacuola unida a membrana que contiene una variedad de enzimas hidrolíticas, todas activas a pH ácido y capaces de degradar varias uniones encontradas en las macromoléculas. Basados en esos dos avances Hers y col. describieron la alfa glucosidasa acida (GAA) presente en los lisosomas, como una enzima activa a pH acido capaz de liberar la glucosa a partir del

glucógeno, al igual que la maltosa (Hers, 1963). Adicionalmente, este mismo grupo demostró que la maltasa acida estaba ausente en el tejido de cuatro infantes con enfermedad de Pompe clásica, y en un quinto niño quien también tuvo un cuadro clínico de inicio temprano con afección muscular severa pero sin cardiomegalia significativa.

Debido a que el principal sitio de almacenamiento y metabolismo del glucógeno es el citoplasma, todos esos descubrimientos revelaron un inesperado rol de los lisosomas en la degradación del glucógeno, presumiblemente seguido de autofagia del glucógeno intra-citoplasmático (Hers, 1963; Lejeune, 1963). Como resultado de dichos aportes la enfermedad de Pompe (OMIM 232300) fue la primera en ser descrita como Enfermedad de Depósito Lisosomal (EDL).

D'Ancona et al, y Salomón et al, localizaron el gen de alfa glucosidasa acida al cromosoma 17 y designado GAA (D'Ancona, 1979; Solomon, 1979). Posteriormente por hibridación *in situ* fluorescente, Kuo et al, mapeo la localización regional del gen GAA a 17q25.2-q25.3 (OMIM 606800) (Kuo, 1996). Todos estos avances han fomentado la base para entender las causas genéticas y fisiopatológicas que están involucradas en el desarrollo de esta entidad.

1.2 EPIDEMIOLOGIA

La incidencia a nivel mundial de la enfermedad de Pompe (EP) es de 1 en 40.000 nacidos vivos (Martiniuk, 1998; Ausems, 1999; Hirschhorn, 2001; Kemper, 2007) dividida en 1 en 138.000 para la forma de inicio temprano y 1 en 57.000 para la forma de inicio tardío (Ausems, 1999); aunque puede ser más alta en ciertas regiones como Israel (Bashan, 1988) y Taiwan (Lin, 1996). Sin embargo, la incidencia de la enfermedad puede variar en diferentes grupos étnicos y para las diferentes formas clínicas. Pues se ha visto que la frecuencia de la enfermedad de inicio infantil en la población caucásica es de 1 en 100.000 y la de inicio tardío es de 1 en 60.000

(Martiniuk, 1998). La frecuencia más alta de inicio infantil está presente entre Afro-americanos (1/14.000)y entre chinos de 1 en 50.000 (Hirschhorn,2001); mientras que frecuencia de la enfermedad de inicio infantil entre individuos de descendencia holandesa es más baja (1/1370.000) (Ausems, 1999; Poorthuis, 1999). (Cuadro 1)

Sin embargo, como con cualquier enfermedad rara, es difícil saber exactamente cuántas personas están realmente afectadas. La extrapolación a partir de las cifras de incidencias asumidas, estima que la prevalencia en todo el mundo actual puede ser 5.000-10.000 personas de ambos sexos y de diferentes edades y grupos étnicos. Aunque se estima que en Europa afecta a menos de 5 por cada 10.000 personas y en Estados Unidos a menos de 200.000 personas (Kanters, 2011).

Cuadro 1. *Incidencia de la enfermedad de Pompe en diferentes poblaciones* (Modificado deTinkle B, 2010)

POBLACION	INCIDENCIA	REFERENCIA
Africano-Americanos	1:14,000 (Infantil)	Hirschhorn & Reuser 2001
Holanda	1:40,000 (Combinada) 1:137,000 (Infantil) 1:57,000 (Tardía)	Ausems et al 1999, Poorthuis et al 1999
Estados Unidos	1:40,000 (Combinada)	Martiniuk et al 1998
Sur de China/Taiwán	1:50,000 (Infantil)	Lin et al 1987
Caucásicos	1:100,000 (Infantil) 1:60,000 (Tardía)	Martiniuk et al 1998
Australia	1:145,000	Meikle et al 1999
Portugal	1:600,000	Pinto et al 2004

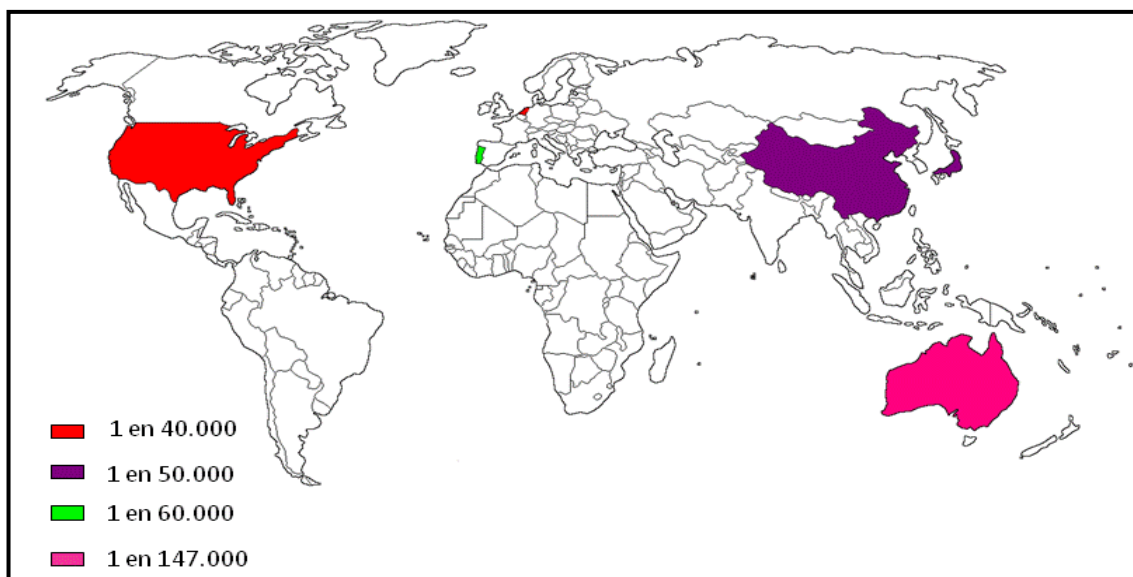


Figura 1. Incidencia de la enfermedad de Pompe en diferentes poblaciones. Rojo: EU y Holanda; Morado: China, Verde: Portugal; Rosado: Australia

1.3 BIOLOGÍA MOLECULAR DEL GEN ALPHA-GLUCOSIDASA ACIDA (GAA)

1.3.1 Localización cromosómica de GAA

Por hibridación celular somática en humano/ratón, D'Ancona et al. y Solomon et al asignaron el gen de alfa 1-4 glucosidasa acida (GAA) al cromosoma 17, ellos concluyeron que GAA, probablemente se encontraba sobre 17q (D'Ancona, 1979; Solomon, 1979). Más tarde mediante hibridación *in situ*, Halley et al, mapearon el locus de GAA a 17q23-q25. Un año después Martinuk et al, mediante estudios de hibridación celular somática, refinaron la localización regional de GAA en 17q21.2-q23 (Halley, 1984; Martiniuk, 1985). Finalmente por estudios de hibridación *in situ* fluorescente Kuo et al, mapeo tanto el gen GAA como el gen timina Kinasa (TK1) en 17q25.2-q25.3. El gen GAA esta genéticamente ligado al locus de timina quinasa (TK), tanto en humanos como en ratones sin embargo el mostro que GAA es distal a TK1 (Kuo, 1996; Hirschhorn, 2001) (Figura 2).



Figura 2. Localización cromosómica del gen *alpha-glucosidasa acida* (GAA). La flecha indica la posición de gen GAA sobre el brazo largo del cromosoma 17 (17q25.2-q25.3) y la barra de color rojo su localización exacta. (Tomado de: <http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks?db=hg19&hgFind=omimGeneAcc&position=606800>)

1.3.2 Estructura del gen GAA

Para estudiar la enfermedad a nivel molecular, previamente se aisló y secuenció el cDNA (3.6 Kb) para el GAA humano. Se aisló la estructura del gen, se mapeó y determinó la secuencia de las uniones intron-exon (Martiniuk, 1991). Hoefsloot et al demostró que el gen GAA contiene 20 exones y 19 intrones extendidos sobre una distancia de 20 Kb (Figura 2). El primer exón tiene solamente una secuencia 5' no traducida, y está separado por aproximadamente un intron de 2.7 Kb, del segundo exón que contiene la secuencia del codón de inicio ATG (Martiniuk, 1991), este codón está localizado a 33 pb del inicio del segundo exón (Hoefsloot, 1990).

El segundo y último exón son grandes (578 y 607 pb); los exones restantes están dentro del rango de 85 a 187 pb (Martiniuk, 1991; Hirschhorn, 2001). El segundo exón codifica para el péptido señal, la pre-secuencia del precursor de la *alpha-glucosidasa acida* y los primeros 61 aminoácidos del precursor de 76 KDa (Hoefsloot, 1990). El dominio del sitio catalítico conservado evolutivamente está contenido en los exones 10 y 11 (Hirschhorn, 2001). La secuencia precedida al exón 1 fue determinada. Un fragmento de 400 pb corriente arriba del primer exón (no codificante) es suficiente para promover la expresión. Esta región tiene las

características de un gen housekeeping debido a que tiene un alto contenido de Guaninas y Citocinas (80%) con por lo menos cuatro sitios de unión potencial al factor de transcripción SP1; las secuencias parecidas a los motivos TATA y CCAAT están ausentes (Hoefsloot, 1990).

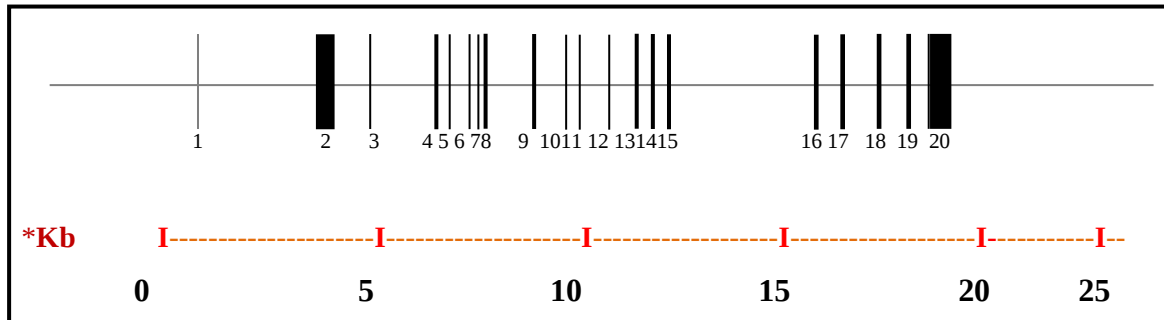


Figura 3. *Estructura genómica de GAA humana*. Las barras representan los exones, las líneas horizontales representan los intrones, el color gris representa secuencias sin traducir. (Modificado de Hirschhorn, 2001). *El tamaño del gen se muestra en kb.

1.4 ALPHA GLUCOSIDASA ACIDA (GAA)

1.4.1 Descripción

La alfa glucosidasa acida (GAA, EC 3. 2.1.20/3) es una enzima lisosomal que cataliza la hidrólisis de los enlaces glucosídicos α -1,4 y α -1,6 del glucógeno, llevándolo a glucosa (Sugawara, 2009).

Esta enzima es sintetizada y procesada a lo largo de una vía común para varias enzimas lisosomales solubles, involucrando extensas modificaciones post-transduccionales. Estudios bioquímicos y moleculares han proporcionado evidencia que la enzima sin procesar es catalíticamente inactiva, y demostraron que el

procesamiento proteolítico resulta en un incremento en la actividad del sustrato natural, glucógeno. (Hirschhorn, 2001).

Análisis molecular del transcrito de alfa glucosida acida humana (GAA).

Martiniuk et al, aisló el cDNA con características de cDNA de alfa glucosidasa lisosomal. Ellos encontraron que este cDNA tenía un mRNA de 3.4 Kb consistente con el tamaño de la enzima, cerca de 105 KDa (Martiniuk F, 1986). En 1988 la secuencia de aminoácidos de la maltasa acida se derivó a partir de la secuencia de nucleótidos del cDNA clonado. El cDNA consistió en 3,636 nucleótidos y con un mRNA de 3,6 Kb. (Hoefsloot, 1988).

La región codificante del gen predice una proteína de 952 aminoácidos no glicosilada que incluye una secuencia-señal en el extremo amino-terminal para su síntesis en retículo endoplasmático (Hirschhorn, 2001; Suwagara, 2009).

Dentro del retículo endoplasmático, la enzima es N-glicosilada, resultando en una forma precursora de masa molecular de 110 KDa. Subsecuentemente, la enzima es transportada al aparato de Golgi, en donde ocurren modificaciones en las cadenas de azúcares por fosforilación sobre los residuos de manosa de los carbohidratos, evidenciando un marcador de reconocimiento vía manosa-6- fosfato que es blanco de los lisosomas. La enzima es adicionalmente modificada por clivajes proteolíticos sobre el extremo C-terminal, principalmente dentro de los lisosomas; donde la enzima ejerce su función, dichas modificaciones producen una forma intermedia de 95 KDa y finalmente las formas maduras de 76 y 70 KDa (Figura 3) (Wisslaar, 1993, Hirschhorn, 2001).

1.4.2 Modificaciones post-transduccionales

1.4.2.1 Glicosilación. La enzima es extensamente modificada post-traduccionalmente por glicosilación dentro de Retículo Endoplasmático (RE) en todos sus siete sitios

predictivos de glicosilación en los codones 140, 233, 390, 470, 652, 882, y 925 (Figura 4).

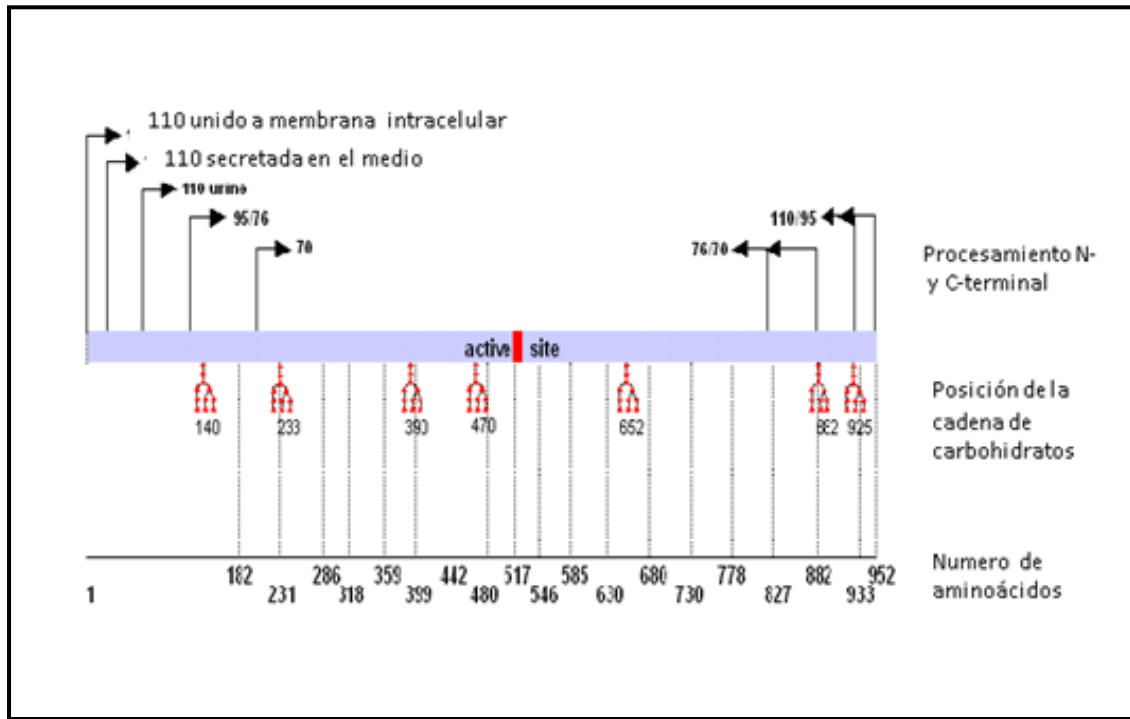


Figura 4. *Procesamiento de alpha glucosidasa humana (GAA)*. Los sitios de glicosilación fosforilación y glicosilación se muestran en la figura con sus correspondientes formas: precursora (110KDa), intermedia (95KDa) y maduras (76 y 70KDa), la posición de la cadena de carbohidratos que sufren glicosilación están representados de rojo, al igual que la posición del sitio activo (www.pompecenter.nl).

Estudios moleculares indican que todos los siete sitios potenciales de glicosilación son utilizados (Hermans, 1993). Los sitios Asp-882 y Asn-925 se encontraron localizados en C-terminal del propéptido que es clivado durante la maduración. La eliminación de seis de los siete sitios no altera la síntesis o función de la enzima, sin embargo al remover el segundo sitio de glicosilación Asn-233 se interfiere dramáticamente con la formación de la enzima madura. (Hermans, 1993).

La sustitución de glutamina por asparagina en cualquiera de esos seis sitios resultan en una reducción en tamaño de la proteína en aproximadamente 2KDa. Sin embargo no hay alteración en la actividad total, procesamiento o localización. En contraste, la delección del sitio en el codón 233 permite una síntesis normal pero reduce la actividad total al 20% de lo normal, retrasa el transporte al aparato de Golgi e interfiere con la localización lisosomal y maduración de la enzima. Por tanto esos resultados sugieren que la glicosilación en el sitio del codón 233 es esencial para la estabilidad, localización y maduración o que la sustitución de la glutamina en este sitio resulta en una proteína inestable (Hirschhorn, 2001). La estimación de cinco sitios glicosilados en la enzima madura de 76 KDa y cuatro en la enzima de 70 KDa es consistente con previas determinaciones bioquímicas de cuatro a cinco sitios glicosilados en la enzima madura (76 y 70 KDa); todos estos resultados concluyen y demuestran que todos los sitios potenciales de glicosilación son utilizados en la enzima madura (Hermans, 1993).

1.4.2.2 Fosforilación de los residuos de manosa. La fosforilación de los residuos de manosa asegura un eficiente transporte de la enzima a los lisosomas, vía receptores manosa 6-fosfato (Hermans, 1993). Los oligosacaridos de manosa de la enzima lisosomal son fosforilados en el aparato de Golgi por una acción secuencial de dos enzimas (Hirschhorn, 2001). Después de la remoción de los tres residuos de glucosa terminales de la cadena de oligosacaridos precursora en el retículo endoplasmático, la mayoría de enzimas lisosomales obtienen un marcador de reconocimiento de manosa 6-fosfato como señal blanco lisosomal. El transporte a los lisosomas, continua vía cisterna trans-Golgi al retículo trans-Golgi. La unión a los receptores manosa 6-fosfato en esta parte de la vía de transporte es esencial como blanco de lisosoma (Hermans, 1993).

1.4.2.3 Procesamiento proteolítico. En un estudio realizado por Moreland R et al, demostró que el procesamiento proteolítico de GAA purificada a partir de placenta humana consiste de 4 diferentes péptidos procesados a partir de un único precursor

(Figura 5). En donde, el precursor de 110KDa es internalizado vía receptores manosa 6-fosfato y sometido a clivajes proteolíticos. Adicionalmente, describieron que la GGA es sintetizada como un precursor de 105KDa con un extremo N-terminal muy hidrofóbico, que contiene una secuencia señal que permite la translocación de la proteína al retículo endoplasmático (RE) (Moreland, 2005).

El clivaje del péptido señal ocurre en el segundo sitio de clivaje potencial, entre Glicina en el codón 28 e Histidina en el codón 29. Cuando esta secuencia señal es clivada, la enzima, posteriormente es transportada a RE. Seguido de la remoción del péptido señal, la enzima precursora es procesada proteolíticamente dentro de los endosomas y/o lisosomas principalmente. El primer precursor contiene los aminoácidos 57 a 952, resultado de clivajes proteolíticos entre los aminoácidos 56 y 57 (Figura 5). Seguido del clivaje del péptido señal, el procesamiento ocurre en el primer extremo N-terminal que genera la especie de 95 KDa, en el primer aminoácido glicina (codón 123); la enzima madura de 76 KDa es generada por un clivaje proteolítico en su extremo C-terminal de la especie de 95 KDa entre los aminoácidos 792-952. Adicionalmente, el proceso proteolítico en N-terminal genera la especie de 70 KDa de la enzima madura, con Alanina en el codón 204 (aa 204-781) (Figura 5) (Moreland, 2005).

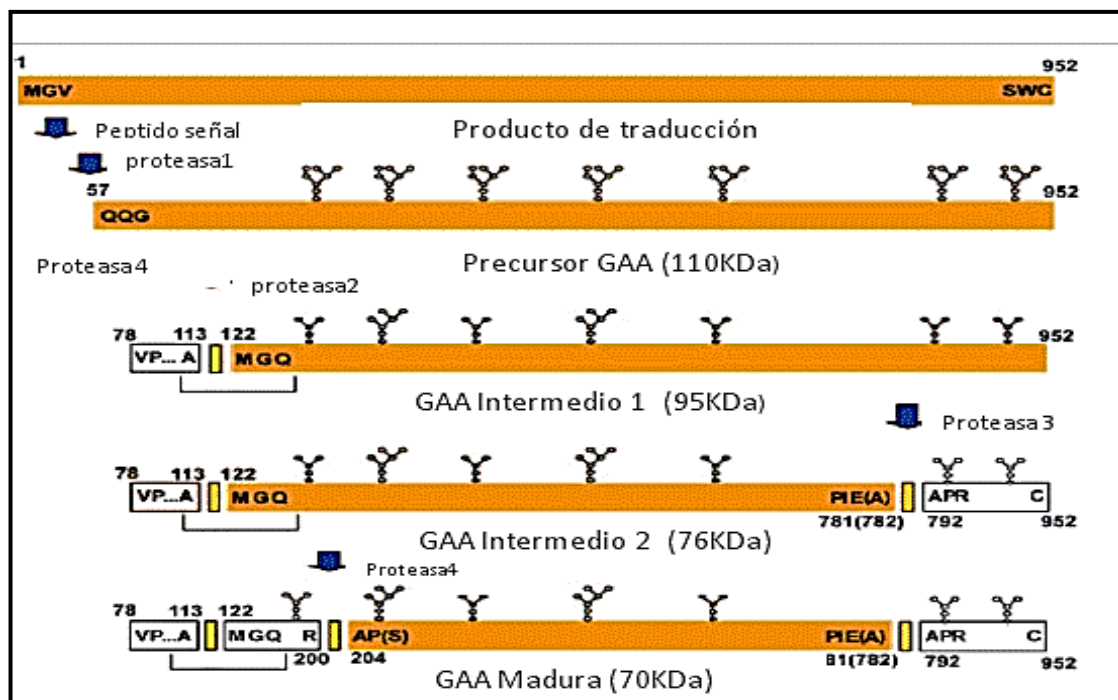


Figura 5. *Modelo de maduración de GAA* (Tomado de Moreland, 2005)

Adicionalmente, se puede concluir que el procesamiento proteolítico es requerido para la actividad catalítica de la enzima por tanto indispensable para su función (Hirschhorn, 2001).

1.4.3 Caracterización del sitio catalítico

Para obtener más información directa sobre el rol de residuos potencialmente importantes en la región del sitio catalítico, Hermans et al, realizaron la sustitución de aminoácidos por medio de mutagénesis-sitio dirigida en Asp 513, Trp-516 y Asp-518, demostrando que estos tres residuos de aminoácidos son críticos para la función catalítica. Uno de los más sutiles cambios, la sustitución de Asp-513 por Glu-513 tuvo el efecto más dramático, ya que la modificación post-traducciona y el transporte intracelular de GAA fueron bloqueados (Hermans, 1991). El precursor mutante parece ser sintetizado normalmente pero no es secretado ni convertido a enzima madura, reduciendo la actividad de la enzima al 25% de lo normal, esta reducción parece

reflejar anomalías en la ruta, procesamiento y maduración de la enzima mutante como lo evidencia la ausencia de enzima secretada y de la forma madura de 76 KDa (Hirschhorn, 2001).

Las substituciones de Trp-516 por Arg-516 y de Asp-518 por Glu-518, Asn-518, o Gly-518 fueron más informativas, estas mutaciones no interfieren con la maduración de la enzima. La pérdida de actividad causada por la substitución isostérica de Asp-518 por Asn-518 y por la alteración de Asp-518 a Gly-518 puede ser explicada por la pérdida de un grupo carboxil esencial. Esto sugiere que la conformación espacial del grupo *B*-carboxil en la posición Asp-518 es de crucial importancia, reduciendo la actividad de GAA en un 4-10% del normal (Hirschhorn, 2001). También, la substitución de Trp-516 por Arg-516 lleva a la pérdida de la función catalítica, reduciendo su actividad al 15% de lo normal. En conclusión los resultados indican que Asp-518 es la base catalítica de GAA lisosomal.

1.5 ESTRUCTURA DE LA PROTEÍNA GAA

Hasta la fecha la proteína no ha sido cristalografiada pero basados en modelos de homología de glucoamilasas intestinales se ha diseñado un modelo tridimensional de la proteína GAA humana, revelando que su estructura esta formada por 5 dominios: el dominio trefoil tipo-P (entre los residuos 89-135), N-terminal β -sandwich (residuos 136-346), barril catalítico (β/α)₈ (residuos 347-723), dominio C-terminal-proximal (residuos 724-818) y C-terminal distal (residuos 818-952) (Figura 6). La actividad catalítica de la enzima está localizada en los residuos Asp518 y Asp616 ubicados en el dominio N-terminal β -sandwich y los siete sitios predictivos de glicosilación se encuentran ubicados en las posiciones: 140, 233, 390, 470, 652, 882 y 925 de la proteína (Sugawara, 2009).

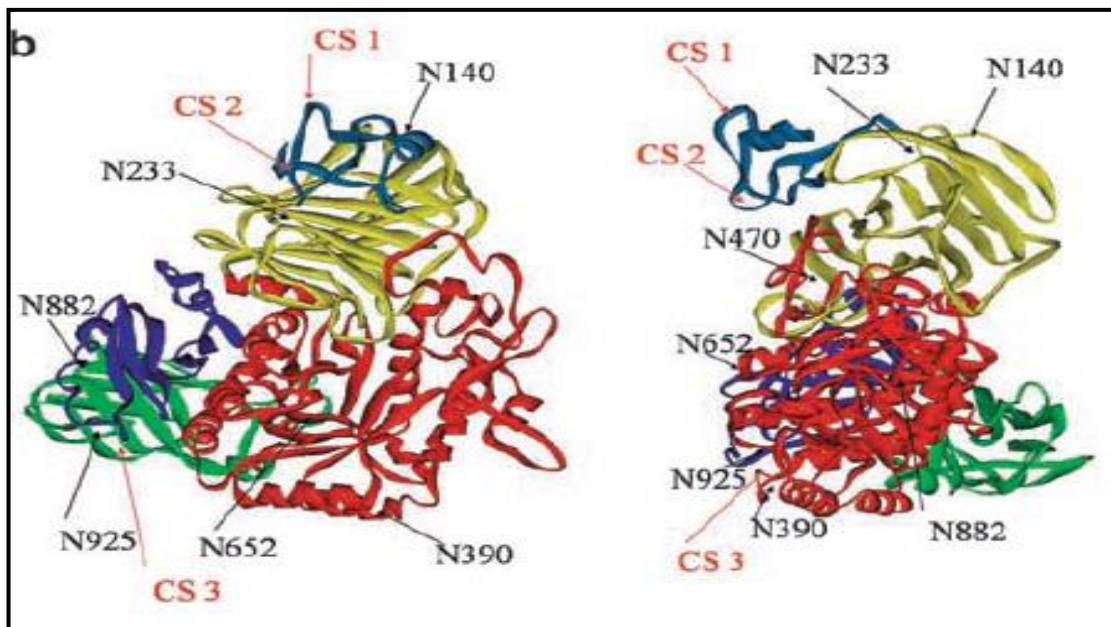


Figura 6. Estructura y modelo tridimensional de la proteína GAA. La GAA humana está compuesta de 5 distintas regiones: trefoil tipo-P (azul-grisáceo), β -sandwich N-terminal (amarillo), barril catalítico (β/α)₈ (rojo), dominios C-terminalproximal (azul) y C-terminal distal (verde) CS1, Cs2, CS3 corresponden a los tres principales sitios de proteólisis; N140, N233, N390, N470, N652, N882, N925 son los siete sitios predictivos de glicosilación (Sungara, 2009).

1.6 PATOLOGÍA

La EP (OMIM #232300) es caracterizada principalmente por la pérdida parcial o total de la actividad de la enzima alfa-glucosidasa acida lisosomal (EC 3.2.1.20), la cual es necesaria para la hidrólisis del glucógeno, que es almacenado dentro del lisosoma (Figura 7).

La deficiencia de la enzima GAA conlleva a la acumulación intra-lisosomal de glucógeno, virtualmente en todas las células del cuerpo, pero los efectos son más notables en músculos; principalmente esquelético y cardíaco (Raben, 2007).

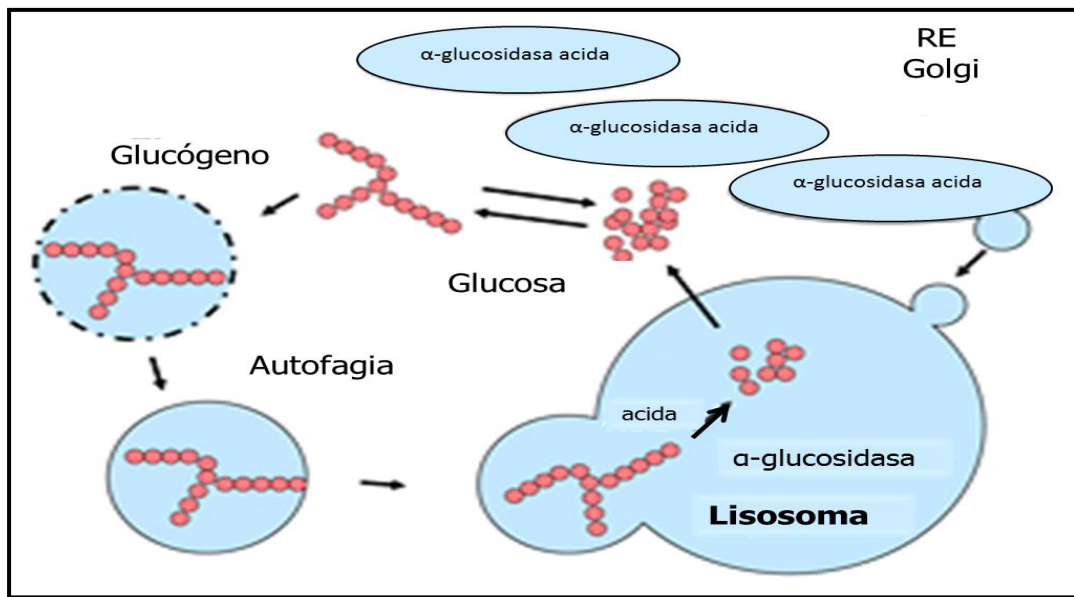


Figura 7. *Degradación del glucógeno en el lisosoma por la alfa glucosidasa acida GAA (Hagemans, 2006).*

En el citoplasma, la glucosa es convertida a glucógeno, un polímero de glucosa, como una forma de almacenamiento de energía. Cuando la energía es necesaria, el glucógeno es degradado nuevamente a glucosa. El glucógeno en el citoplasma es capturado en una membrana y transportado a los lisosomas en un proceso llamado “autofagia” (figura 7). En los lisosomas este glucógeno es degradado por la enzima alfa glucosidasa acida. Cuando la alfa glucosidasa acida es deficiente, el glucógeno lisosomal no es degradado y se acumula.

El mecanismo patológico de la acumulación de glucógeno que eventualmente causa disfunción muscular no es completamente entendido, aunque en estudios recientes esta problemática ha sido abordada. La pérdida gradual de la masa muscular en la EP ha sido explicada por el incremento de la destrucción tisular debido a la acción de enzimas autolíticas, que han sido liberadas desde los lisosomas luego de la lisis secundaria a la acumulación intralisosomal (Umpleby, 1987), el glucógeno es intercalado entre las miofibrilla produciendo daño muscular (Figura 8) (Raben, 2002). Además por una combinación de atrofia y estrés oxidativo muscular que

produce apoptosis de los miocitos reflejado en la apariencia de lipofuscina (Hesselink, 2003). Se considera que la interacción mecánica entre las inclusiones no contráctiles y las miofibrillas cercanas altera la morfología miofibrilar y la transmisión longitudinal de la fuerza en las células musculares restantes (Drost, 2005).

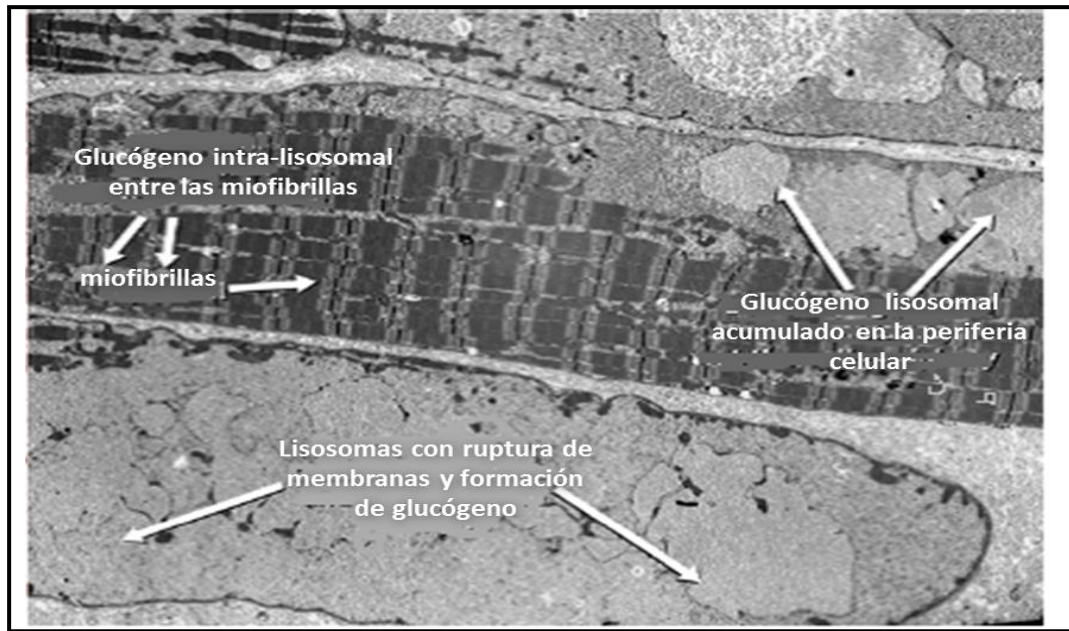


Figura 8. *Mecanismo Patológico de la enfermedad de Pompe* (modificado de Raben, 2002). Se muestra la ruptura de membrana lisosómica por exceso de glucógeno, el glucógeno es intercalado entre las miofibrillas con eventual destrucción del tejido muscular donde las miofibrillas son reemplazadas por glucógeno

La opinión sobre la patogénesis, que se presentó hace más de 20 años atrás, describía que los lisosomas de células musculares tenían poco espacio para expandirse, por lo que el daño muscular ocurría cuando los lisosomas cargados de glucógeno eran sometidos a estrés mecánico llevando a ruptura de la membrana lisosomal (Griffin, 1984). En los últimos años se han generado considerables evidencias de que este punto de vista de la patología es incompleto.

Raben, et al, describieron que la patología celular en la EP se debe a un defecto en la vía endocítica y en la vía de autofagia, lo que conduce a una acumulación excesiva de vesículas autofagicas en fibras musculares resistentes a terapia (ratones knock out-GAA) (Raben, 2007). Se ha demostrado que la autofagia disfuncional no es menos, si no más, critica en la patogénesis de la EP y en la respuesta del musculo a terapia (Fukuda, 2006, Raben, 2010).

La autofagia es un proceso de degradación lisosomal de proteínas de larga vida y organelos dañados. En la autofagia, las vesículas de doble membrana se conocen como autofagosomas, estos secuestran los organelos dañados y sustancias embebidas en el citoplasma. Los autofagosomas en asociaciación con los endosomas dan lugar a anfisomas, que se fusionan con los lisosomas donde se completa la degradación del contenido autofagosomal (Liou, 1997; Berg, 1998).

La autofagia es un mecanismo de sobrevivencia bajo condición de privación de nutrientes. Bajo condiciones normales, los fagosomas y anfisomas son rápidamente degradados por los lisosomas y su contenido es reciclado. Por el contrario en fibras musculares tipo II de ratones knock out-GAA se observa una acumulación significativa de autofagosomas (Shea, 2009) (Figura 9).

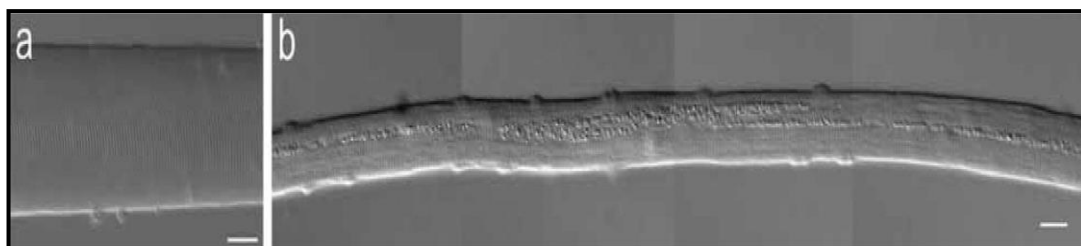


Figura 9. *Imágenes de microscopia de contraste de fibras musculares.* (a) Wild Type de 6 meses de edad y (b) Ratón Knockout-GAA. Centralmente se localiza la acumulación autofagica, es claramente visible en toda la longitud de la fibra del ratón Knock out-GAA (Shea, 2009).

Todos esos datos indican que una profunda falla en la autofagia causa daño del músculo esquelético, donde la acumulación de vacuolas autofagicas puede indicar sobre-regulación de la autofagia y/o defectos en la fusión autofagosoma-lisosoma (Shea, 2009).

Previamente se demostró que las inclusiones autofagias en el músculo son considerables en pacientes adultos y en modelos de ratón, sin embargo Raben, et al. realizaron un estudio que evaluó esta contribución en infantes, antes y seis meses después de TRE. Inesperadamente el componente autofagico, sobresaliente en pacientes jóvenes y adultos, fue insignificante en infantes, sin embargo la característica dominante fue la presencia de lisosomas ampliamente expandidos; después de los 6 meses de TRE, se vuelve visible la acumulación autofagica. En la mayoría de las fibras, las dos patologías no parecen coexistir. Estos datos apuntan a la posibilidad de diferencias en la patogénesis de enfermedad de Pompe infantil y adulto (Raben, 2010).

En la caracterización de la progresión de la enfermedad en infantes, se propusieron cinco etapas: en la primera etapa, las células musculares contienen pequeños lisosomas llenos de glucógeno, lo que es seguido por la expansión de los lisosomas y fugas de glucógeno en el citoplasma en algunas áreas, a medida que enfermedad progresa, la ruptura lisosomal continúa hasta que la mayoría del glucógeno es citoplásmica, dando lugar a una ruptura completa de la arquitectura muscular (Thumberg, 2006; Raben, 2010)

Esta descripción, sin embargo crea la impresión que la expansión lisosomal y ruptura es la patología universal de la enfermedad de Pompe. Por otro lado, los resultados en pacientes adultos y en modelos de ratón, sugieren un predominante rol de la autofagia en la patogénesis de la EP y de nuevo crean una impresión que esta patología es relevante para todas las formas (Raben, 2010)

1.7 PRINCIPALES VÍAS METABÓLICAS DEL GLUCÓGENO EN MUSCULO

La glucosa entra a las células musculares a través de proteínas transportadoras y es sometida a fosforilación por hexoquinasas, después es blanco para la glicolisis o síntesis de glucógeno por la glucógeno sintasa (Figura 10). El glucógeno, un polímero de glucosa ramificado que contiene 93% de enlaces α 1-4 y 7% de enlaces α 1-6; es un dinámico reservorio de energía para los músculos. La síntesis o degradación depende sobre la actividad de enzimas específicas que son sometidas a fosforilación reversible por Cinasas. El metabolismo del glucógeno es además influenciado por la cinasa que es activada por monofosfato de adenina (AMP), la cual se encuentra asociada al glucógeno regulando el consumo de glucosa, y además por actividad lisosomal.

Defectos en las vías de degradación del glucógeno (involucrando la glucógeno fosforilasa, fosforilasa cinasa, fosfoglucomutasa, fosfofructocinasa, fosfoglicerato cinasa, deshidrogenasa láctica y enzimas ramificadoras y desramificadoras) resulta en la acumulación de glucógeno y síntomas musculares esqueléticos inducidos por el ejercicio y mioglobinuria, con o sin manifestaciones cardíacas. AMPK, consta de subunidades α , γ y β , también regula la oxidación de ácidos grasos a través de la fosforilación de acetil I CoA carboxilasa (acetil I CoA carboxilasa-P). Defectos en PRKAG2 (la subunidad reguladora de AMPK), LAMP2 o glucosidasa ácida causa acumulación progresiva de glucógeno, resultando en hipertrofia cardíaca y anormalidades electrofisiológicas (Arad, 2005).

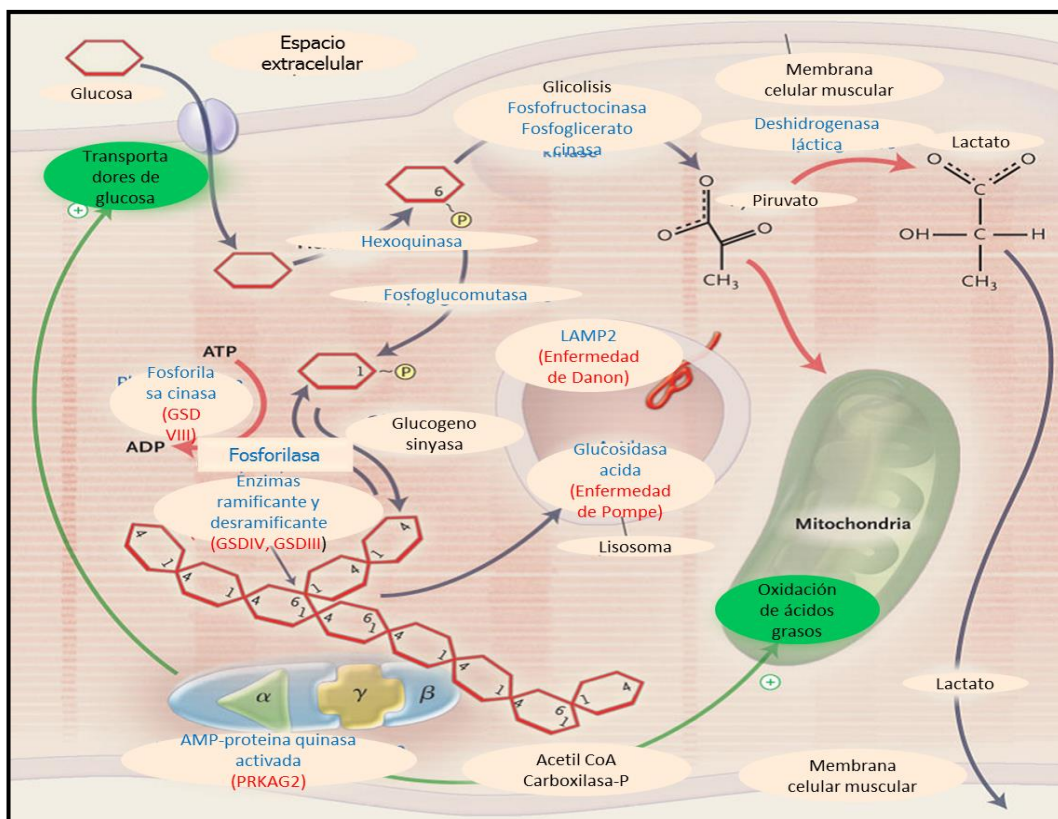


Figura 10. Principales vías metabólicas del glucógeno en músculo. Las proteínas (letras en azul) involucradas en Enfermedades de almacenamiento de glucógeno (GSDs) asociadas con cardiomiopatía (letras en rojo) son mostradas en la figura. (Modificado de Arad, 2005).

1.8 ASPECTOS CLÍNICOS DE LA ENFERMEDAD DE POMPE

1.8.1 Manifestaciones clínicas

La EP tiene un amplio espectro clínico y continuo que varía en términos de edad de inicio, tasa de progresión de la enfermedad, la expectativa de vida y el órgano involucrado. Los síntomas pueden ocurrir entre los primeros pocos meses de vida, pero también pueden aparecer en individuos hasta 60 años (Kishnani, 2006; Di Rocco, 2007).

La gran variabilidad fenotípica ha llevado a la creación de tipos basados en la edad de inicio y órgano involucrado. Esos subtipos han sido referidos inconsistentemente en la literatura con varias terminologías como infantil, infantil-tardío, infancia, juvenil, y la forma de inicio adulto, Kishnani considera la enfermedad de Pompe en un espectro continuo de la enfermedad que varía por la edad de inicio, órgano involucrado y grado de miopatía (Kishnani, 2006). En un intento de establecer una terminología uniforme; en términos generales la enfermedad se clasifica en forma infantil y en forma de inicio tardío como se resume en la Cuadro 2.

Cuadro 2. *Clasificación de la enfermedad de Pompe* (van den Hout, 2003; Kishnani, 2004; Kishnani, 2006)

Forma Infantil (incluye)	Forma de inicio Tardío (incluye)
Enfermedad rápidamente progresiva que se caracteriza por: • Cardiomegalia • Hepatomegalia • Debilidad • Hipotonía • Muerte por falla cardio-respiratoria antes del primer año de vida. Esta representa la forma más severa de la enfermedad y es referida como enfermedad infantil clásica.	La forma adulta se caracteriza por: • Miopatía lentamente progresiva, predominantemente involucra músculo esquelético • Se presenta durante la segunda a sexta década de vida
Pacientes con una variante de forma infantil (enfermedad de Pompe no clásica) • Progresión lenta de la enfermedad	Infantil, juvenil o una variante muscular que es un grupo heterogéneo que usualmente se presenta después de la infancia y no incluye cardiomiopatía severa

• Cardiomiopatía menos severa, pero presentada en el primer año de vida	
---	--

1.8.2 Enfermedad de inicio infantil

El cuadro clínico que predomina es una miocardiopatía, que es la consecuencia de acumulación de glucógeno en corazón, la hipertrofia cardíaca inicia en útero y llega a ser significativa en los primeros meses de vida. La cardiomegalia masiva es evidente en rayos X, y elecocardiograma permite identificar el incremento en el grosor de las paredes ventriculares y el septum intraventricular conduciendo a obstrucción del ventrículo izquierdo. (Di Rocco, 2007, Chien, 2007).

Anormalidades de la conducción cardíaca son debido a la interferencia del almacenamiento de glucógeno con tejidos conductivos, produciendo taquiarritmia, la cual puede acusar muerte repentina durante infecciones, deshidratación y anestesia (Di Rocco, 2007). El electrocardiograma típicamente muestra intervalos PR cortos y complejos QRS altos característica que puede diferenciar la EP de otras causas de enfermedad cardíaca en infantes (Chien, 2007).

Adicionalmente, los pacientes cursan con debilidad muscular progresiva, signos de niño hipotónico e insuficiencia respiratoria progresiva, características clínicas claves para la sospecha diagnóstica. También pueden cursar con organomegalias (hepatomegalia y esplenomegalia), macroglosia y dificultades de alimentación (Kishnani, 2004; Di Rocco, 2007).

En pacientes que no son tratados la mediana de edad de muerte oscila entre los 6-8.7 meses (Kishnani, 2006). En EP infantil la mortalidad es alta entre un 92-95% durante el primer año de vida. (Corzo, 2004). Una corte de pacientes manifestaron EP en el

primer año de vida, independientemente de su fenotipo, el 74% murió al año de edad, el 91% a los dos años de edad, y 93% a los tres años (Corzo, 2004, Kishnani, 2006). La muerte resulta por lo general de insuficiencia cardíaca y respiratoria (Hirschhorn, 2001; Corzo, 2004; Kishnani, 2006).

Cuadro 3. *Signos y Síntomas en la Enfermedad de Pompe de Inicio Infantil* (Modificado de Kishnani, 2004)

Signos y síntomas
Debilidad muscular profunda y rápidamente progresiva Apariencia de "floppy baby" Músculos de la pantorrilla duros en la palpación Hipotonía axial Laxidad de músculos faciales Arreflexia Cardiomegalia-Cardiomiopatía y/o falla cardíaca Moderada hepatomegalia Macroglosia Dificultades en la alimentación (deglución, succión), pobre ganancia de peso Infecciones respiratorias frecuentes Insuficiencia o aflicción respiratoria Retraso motor Marcada elevación de creatinina-quinasa (CK) Curso de la enfermedad rápidamente progresivo

1.8.2.1 Cardiomegalia y cardiomiopatía. La mayoría de infantes con EP desarrollan una masiva y progresiva cardiomegalia antes de los seis primeros meses de vida. La acumulación de glucógeno en músculo cardíaco causa aumento en el grosor de las paredes de ambos ventrículos y del tabique interventricular, resultando en cardiomiopatía hipertrófica, que progresa a cardiomiopatía dilatada. El incremento de

grosor del ventrículo izquierdo puede también llevar a obstrucción del flujo del ventrículo izquierdo (Kishnani, 2004; Di Rocco, 2007; Chien, 2007).

Los hallazgos patológicos demuestran que a la autopsia, el corazón puede estar más de tres veces aumentado con respecto a su tamaño normal, comúnmente con fibroelastosis endocardial. Los resultados electrocardiográficos son sorprendentes, revelando el intervalo PR corto, a veces acompañado de complejos QRS largos. Los infantes con EP infantil atípica desarrollan hipertrofia ventricular izquierda después de los seis meses de edad pero sin obstrucción del flujo ventricular, permitiendo una función cardíaca más normal (Kishnani, 2004).

La EP debe ser sospechada en infantes con las siguientes manifestaciones (van den Hout, 2003).

- Dificultad en la alimentación/retardo en el crecimiento (44-97% de los casos)
- Retraso motor/debilidad muscular (20-63% de los casos)
- Dificultad respiratoria/ infecciones respiratorias (27-78% de los casos)
- Problemas cardíacos (cardiomegalia, obstrucción ventricular, cardiomiopatía) (50-92%)

En un estudio a nivel mundial de 168 pacientes con EP de inicio infantil, la evolución promedio de la enfermedad fue la siguiente: la media en edad del inicio de los síntomas fue de 2 meses (rango de 0-12 meses), 4.7 meses al diagnóstico (rango prenatal a los 4.2 meses), 5.9 meses al primer soporte ventilatorio (rango 0.1-31.1 meses), y 8.7 meses de muerte (rango 0.3-73.4 meses); la tasa de sobrevivencia a los 12 meses de edad fue de 25.7% y libre de ventilador 16.9%. La frecuencia de los signos clínicos fue: cardiomegalia (92%), hipotonía (88%), problemas respiratorios (78%), debilidad muscular (63%), dificultad al comer (57%) y retraso motor (53%) aparecen después de una edad promedio de 4.0 meses (Kishnani, 2006; Rocco, 2007). El análisis múltiple covariado confirma que el inicio de los síntomas tempranamente

aumenta el riesgo de muerte temprana (Kishnani, 2006), Estos resultados subrayan la necesidad de una valoración y diagnóstico temprano, que permitan una intervención terapéutica precoz, para obtener el máximo beneficio terapéutico.

Cuadro 4. *Frecuencia de síntomas iniciales en la enfermedad de Pompe de inicio infantil* (Kishnani, 2006)

Manifestaciones clínicas	Frecuencia n (%)	Edad de inicio, promedio en meses (+/- SD)
Cardiomegalia	154 (92)	4.1 (3.1)
Hipotonía	148 (88)	3.9 (2.7)
Cardiomiopatía	147 (88)	4.2 (4.7)
Dificultad respiratoria	131 (78)	4.3 (4.4)
Debilidad muscular	105 (63)	4.5 (3.1)
Dificultad e la alimentación	96 (57)	3.4 (2.7)
Retraso del crecimiento	89 (53)	4.2 (2.6)
Falla cardíaca congestiva	84 (50)	5.1 (2.4)
Reflujo gastroesofágico	16 (10)	5.3 (5.6)
Apnea de sueño	6 (4)	4.0 (2.4)

1.8.2.2 Diagnóstico diferencial. La EP comparte características clínicas con algunas de las siguientes patologías: la atrofia muscular espinal tipo I, también conocida como enfermedad de Werding- Hoffmann, es causada por degeneración del núcleo motor en el tallo cerebral y en el asta anterior de la medula espinal. La enfermedad usualmente se presenta dentro de los primeros meses hasta los dos primeros años. Es caracterizada por debilidad muscular generalizada, hipotonía, atrofia muscular, hipermobilidad, ausencia de reflejos tendinosos.

Tal como en Pompe, los infantes con este desorden pueden tener dificultad respiratoria y de la alimentación, al igual que mayor susceptibilidad a infecciones respiratorias. La tasa de progresión varía dependiendo de la edad de inicio. Cuando se presenta en los primeros meses de vida la enfermedad es rápidamente progresiva antes hasta que debilidad muscular aparezca.

La enfermedad de Danon se caracteriza clínicamente por cardiomiopatía hipertrófica y miopatía muscular esquelética, y patológicamente por la presencia de vacuolas citoplasmáticas en células musculares cardiacas y esqueléticas. Las vacuolas contienen material autofagico y glucógeno. El retardo mental puede estar presente en varios pacientes. Como en la EP, la enfermedad de Danon puede presentarse como forma de inicio infantil o como forma de inicio tardío lentamente progresivo. La cardiomiopatía es encontrada en ambos subtipos a diferencia de la EP. La deficiencia en la proteína estructural lisosomal (LAMP 2) es la causa de la enfermedad de Danon. (Hirschhorn, 2001).

La fibroelastosis Endocardial se caracteriza por hipertrofia cardiaca, particularmente en el ventrículo izquierdo, llevando a disfunción cardiaca y pulmonar y eventualmente a falla cardiaca congestiva. Los síntomas típicamente se presentan entre los 4-12 meses de edad con disnea, irritabilidad, tos, debilidad, fatiga, palidez facial, retardo en el crecimiento y cianosis periférica (Harrison, 2001). La eficiencia de Carnitina es un desorden hereditario de forma autosómica recesiva, en donde hay un defecto en el transporte de la carnitina a través de las membranas. La clínica presenta cardiomiopatía hipertrófica, hipoglicemia hipocetónica con asociada debilidad muscular (Harrison, 2001).

Cuadro 5. *Diagnóstico diferencial Enfermedad de Pompe de Inicio Infantil* (Kishnani P, 2007)

DIAGNOSTICO	SIGNOS Y SINTOMAS COMPARTIDOS	UNICO DE POMPE
ATROFIA MUSCULAR ESPINAL I	Hipotonía, Progresiva debilidad muscular proximal, Ausencia reflejos, Dificultad alimentación	Cardiomegalia
ENFERMEDAD DE DANON	Cardiomiopatía hipertrófica, Miopatía musculo-esquelética, Almacenamiento de glucógeno vacuolar	Organomegalia, Deterioro cognitivo mínimo
FIBROELASTOSIS ENDOCARDIAL	Dificultad alimentación, Cardiomegalia, Falla cardiaca, Ahogo	Debilidad muscular pronunciada
DEFICIENCIA DE CARNITINA	Cardiomiopatía, Debilidad muscular	CK elevada

1.8.2.3 Diagnóstico para enfermedad de Pompe de inicio Temprano

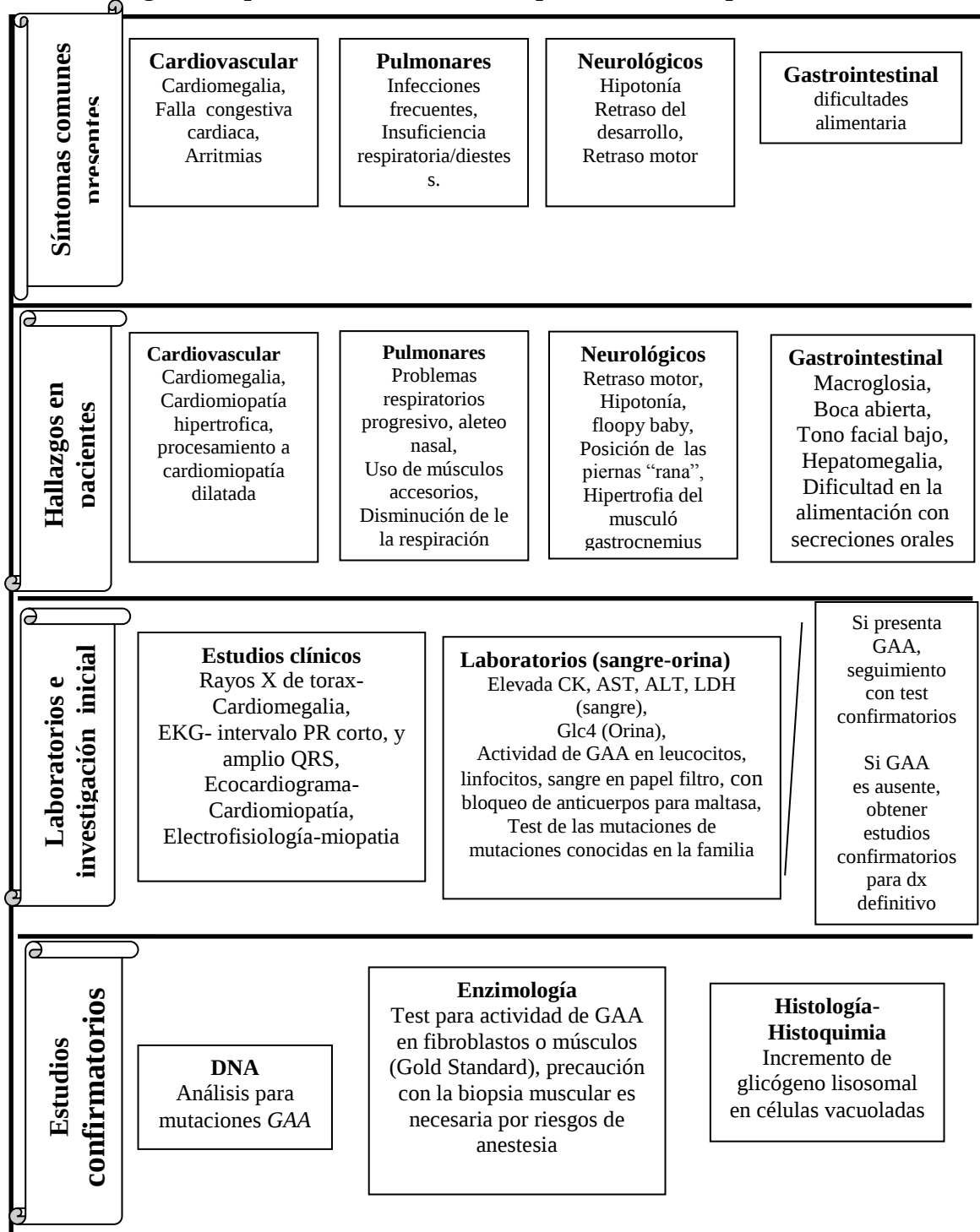


Figura 11. Diagnóstico para enfermedad de Pompe de inicio Temprano (modificado de Kishnani, 2007)

1.8.3 Enfermedad de Pompe de inicio Tardío

La EP de inicio Tardío es causada por una deficiencia parcial de alpha glucosidasa acida, la cual presenta un curso mas insidioso (Forsha, 2011). En la forma de inicio tardío, la actividad residual de GAA en fibroblastos de piel se encuentra entre el 10-40%.(Kishnani, 2004). Puede presentarse en cualquier momento de la vida, desde la niñez hasta la adultez. Se ha descrito que los primeros síntomas están relacionados, o son causados por debilidad muscular, predominando en extremidades inferiores, músculos proximales y paraespinales. Algunos de los daños secundarios en musculo-esqueléticos son contracturas, deformidades, lordosis, escoliosis, pseudo-hipertrofia local y osteoporosis. El compromiso progresivo de la función motora fina y gruesa lleva al uso de silla de ruedas. También, la articulación y fonación pueden encontrarse comprometidos como consecuencia de debilidad motora-oral (DiRocco, 2007).

La falla respiratoria es secundaria al compromiso de los músculos diafragmáticos, convirtiéndose en una causa importante de morbilidad y mortalidad en esta forma de la enfermedad. La edad de muerte varía desde la infancia temprana hasta la adultez, dependiendo de la tasa de progresión, la extensión del compromiso de los músculos respiratorios y otras morbilidades (Kishnani, 2006).El compromiso cardiaco entre los diferentes rangos de la infancia puede variar donde algunos pueden presentar disfunción cardiaca, moderada o ningún tipo de afección, mientras que los pacientes adultos usualmente no tienen compromiso cardiaco clínicamente identificable. (Kishnani, 2004; Kishnani, 2006, DiRocco, 2007). Previos estudios han sugerido que una pequeña proporción de pacientes con EP de inicio tardío (<10%) tienen un compromiso cardiaco, incluyendo anormalidades electrofisiológicas e hipertrofia miocardiaca (Forsha, 2011).

La complicación menos frecuente en la enfermedad de inicio tardío es el compromiso vascular (Hirschorn, 2001). La acumulación de glucógeno en el músculo liso de los vasos sanguíneos resulta en aneurismas y ruptura de arteria basilar,

carótida interna, y arterias cerebrales medias (DiRocco, 2007). En una revisión de 225 casos publicados con EP Tardío, la media de edad de inicio fue a los 24 años (0-68), inicio de ventilación a los 34 años, inicio de uso de silla de ruedas a los 16 años, y la muerte a los 24.5 años. Los pacientes con un inicio tardío de los síntomas tienen un mejor pronóstico (Winkel, 2005).

Cuadro 6. *Signos y Síntomas en la Enfermedad de Pompe de Inicio tardío* (Kishnani, 2004)

SIGNOS Y SINTOMAS
Debilidad muscular progresiva (todos los pacientes) predominantemente proximal Retraso del desarrollo motor Miembros inferiores más afectados que los superiores Hipertrofia de los músculos de la pantorrilla Compromiso de los músculos paraespinales Signo de Gower Hipotonía Retraso de los reflejos tendinosos profundos Dificultad al deglutir Problemas respiratorios Frecuentes infecciones respiratorias, Falla o insuficiencia respiratoria Disnea de esfuerzo Apnea del sueño obstructiva Orthopnea Intolerancia al ejercicio CK elevada Moderada hepatomegalia Cardiomegalia y cardiomiopatía (Leve) Dificultad en la marcha Dolor de cabeza (mañana) Somnolencia Lordosis Escoliosis Dolor lumbar Inteligencia normal

La EP de inicio tardío es muy heterogénea, la ausencia de uno o varios de esos indicadores clínicos no descarta la posibilidad de la enfermedad.

Al igual que como sucede con el subtipo clínico infantil, en la forma de inicio tardío un número de otros desordenes tienen signos y síntomas que se sobrelapan con los vistos en la EP de inicio tardío, lo que puede dificultar el diagnóstico. El síntoma más frecuente, debilidad muscular, es común en la familia de distrofias y otras enfermedades de almacenamiento de glucógeno (GSDs).

La distrofia muscular de Duchenne/Becker usualmente aparece entre los tres y cinco años de edad. Es caracterizada por debilidad muscular proximal progresiva, con predominio del compromiso de miembros inferiores frente a los superiores, llevando a contractura, y pérdida de la deambulación. Escoliosis progresiva escoliosis y falla pulmonar por compromiso de los músculos respiratorios, posteriormente los pacientes llegan a ser más susceptibles a serias infecciones pulmonares. La muerte ocurre en la segunda o tercera década de vida debido a falla respiratoria o cardíaca (Hirschhorn, 2001).

La poliomiositis es una enfermedad muscular inflamatoria que afecta principalmente a adultos. Se caracteriza por debilidad muscular progresiva, típicamente afecta miembros proximales y músculos flexores de la nuca. La Poliomiositis puede ocurrir sola o en conjunto con la enfermedades del tejido conectivo o autoinmunes.

La GSD tipo III es causada por deficiencia de la enzima desramificante del glucógeno, que lleva a hepatomegalia, hipoglicemia, retardo en el crecimiento y cardiomiopatía. La debilidad muscular es usualmente mínima en la infancia pero puede ser severa en la adultez (Harrison, 2001). La GSD tipo VI, también conocida como enfermedad de Hers, es causada por la deficiencia de fosforilasa hepática. Los pacientes usualmente cursan con hepatomegalia y retardo en el crecimiento en la niñez, pero tienden a mejorar y desaparece en la pubertad. El corazón y el musculo

esquelético no están involucrados. La GSD tipo V es causada por una deficiencia en la fosforilasa muscular. Los síntomas usualmente primero aparecen en la edad adulta con intolerancia al ejercicio y calambres musculares. La creatina quinasa esta típicamente incrementada en reposo y se incrementa aun mas seguida del ejercicio (Harrison, 2001).

Cuadro 7. *Diagnóstico diferencial en la enfermedad de Pompe de inicio tardío* (Kishnani, 2006)

DIAGNOSTICO	SIGNOS Y SINTOMAS COMPARTIDOS	UNICO DE POMPE
DISTROFIA MUSCULAR DUCHENNE/BECKER	Progresiva debilidad musculo-proximal, Deterioro respiratorio, Dificultad para caminar	Afecta hombres y mujeres, Mínima a baja actividad de GAA
POLYMYOSITIS	Progresiva debilidad muscular	Extremo gasto muscular, Hipotonía
ARTRITIS REUMATOIDE	Debilidad generalizada, Fatiga, síntomas musculo- esqueléticos	Mujeres/hombres, No involucra articulaciones
GSD III Y VI	Hipotonía, Hepatomegalia, Debilidad muscular, CK elevada	Complicación hepática moderada
ENFERMEDAD DE DANON (ligada a x)	Cardiomiopatía hipertrófica, almacenamiento de glucógeno vacuolar esquelético, miopatía muscular	No complicación cardiaca
GSD V	Calambres durante el ejercicio, CK elevada	Gasto muscular extremo, hipotonía

1.8.3.1 Diagnóstico para enfermedad de Pompe de inicio Tardío

Síntomas comunes	Pulmonares Frecuentes infecciones, Falla –estrés respiratorio, Apnea del sueño, Dolor de cabeza en la mañana, Somnolencia	Musculo- Esquelético Distrofia muscular cintura-miembro,Dolor de espalda, Intolerancia al ejercicio, Síndrome Espinal rígido	Gastrointestinal Dificultad en la alimentación Poca ganancia de peso	
Hallazgos en pacientes pertinentes	Respiratorios Frecuentes infecciones, Insuficiencia respiratoria, Orthopnea Apnea del sueño, Tos débil	Musculo- Esquelético Progresiva debilidad muscular extremidades (cintura-bajas>superiores) Intolerancia al ejercicio, lordosis, escoliosis, Dolor de espalda bajo, Hipotonía, Signo de Gower	Gastrointestinal Dificultad en mantener un peso normal, Dificultad en la masticación Hepatomegalia,	Cardiaca Infrecuente cardiomegalia (juvenil)
Laboratorios e investigación inicial	Estudios clínicos Test de función pulmonar, acostado y sentado, Biopsia muscular-histología e histoquímica, Electrofisiología-miopatía	Laboratorios (sangre-orina) Elevada CK, AST, ALT, LDH (sangre), Elevada Glc4 (Orina), Actividad de GAA en leucocitos, linfocitos, sangre en papel filtro, con bloqueo de anticuerpos para maltasa neutral Test de las mutaciones	Si presenta GAA seguimiento con test confirmatorios Si GAA Esta ausente obtener estudios confirmatorios para dx definitivo	
Estudios confirmatorios	DNA Análisis para mutaciones GAA	Enzimología Test para actividad de GAA en fibroblastos o músculos (Gold Standard), Correlación clínica con los resultados es requerido	Histología-Histoquímica Dependiendo del sitio de la biopsia, Incremento de glicógeno lisosomal en células vacuoladas	

Figura 12. Diagnóstico para enfermedad de Pompe de inicio Tardío (modificado de Kishnani, 2007)

1.9 HETEROGENEIDAD GENÉTICA Y CORRELACIÓN GENOTIPO-FENOTIPO

El desorden es genéticamente heterogéneo, donde se han encontrado hasta la fecha más de 400 diferentes mutaciones en el gen de GAA, incluyendo mutaciones missense, nonsense, en el sitio de splicing, deleciones parciales e inserciones a lo largo de todo el gen (Figuras 13 y 14) (Hirschhorn, 2001, Kroos, 2008). Kroos et al, reporto 289 variaciones, entre las cuales 67 son mutaciones no patogénicas y 197 mutaciones patogénicas, (Kroos, 2008; Pittis, 2008; Oba-shingo, 2009). Sin embargo, la última actualización de Pompe Disease Mutation Database (25 de junio de 2012) a través de <http://www.pompecenter.nl/> lista 452 variaciones en la secuencia del gen GAA. Entre esas, 135 son consideradas muy severas (very severe, clase A), 127 son consideradas como potencialmente menos severas (potentially less severe, clase B), 27 son menos severas (less severe, clase C), 20 potencialmente leves (potentially mild, clase D), cuatro probablemente no patológicas (presumably non-pathogenic, clase E), 93 sugieren un efecto no patológico (non-pathogenic, clase F) y adicionalmente 46 de efecto desconocido (www.pompecenter.nl; Oba-shingo, 2009, Kroos, 2008). (Figura 15)

Entre las variaciones de la secuencia patológicas hay un grupo de mutaciones que afectan el procesamiento post-traducciona l y/o el transporte intracelular de la proteína, que anula parcialmente o completamente su actividad funcional (Pittis, 2008). Varias mutaciones tienen un efecto perjudicial sobre el plegamiento de la proteína que da lugar a defectos en el procesamiento y transporte (Van der Ploeg, 2008; Reuser, 1987; Pittis, 2008). Aproximadamente 63% de esas variaciones de la secuencia llevan a una completa pérdida de la actividad de GAA, 12% a una deficiencia parcial, mientras el 25% no son patogénicas (Kroos, 2007).

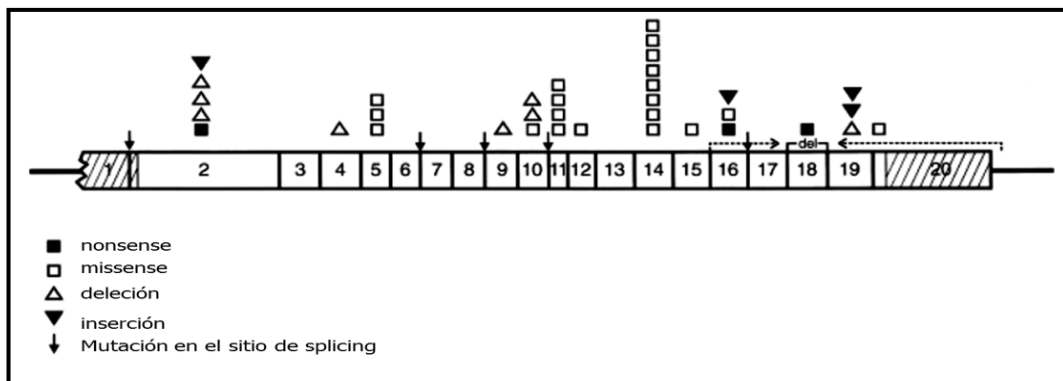


Figura 13. Distribución de los diferentes tipos de mutaciones deletéreas encontradas en pacientes con GSDII, (solo los exones que están indicados con flechas representan las mutaciones en el sitio de splicing) (Hirschhorn, 2001).

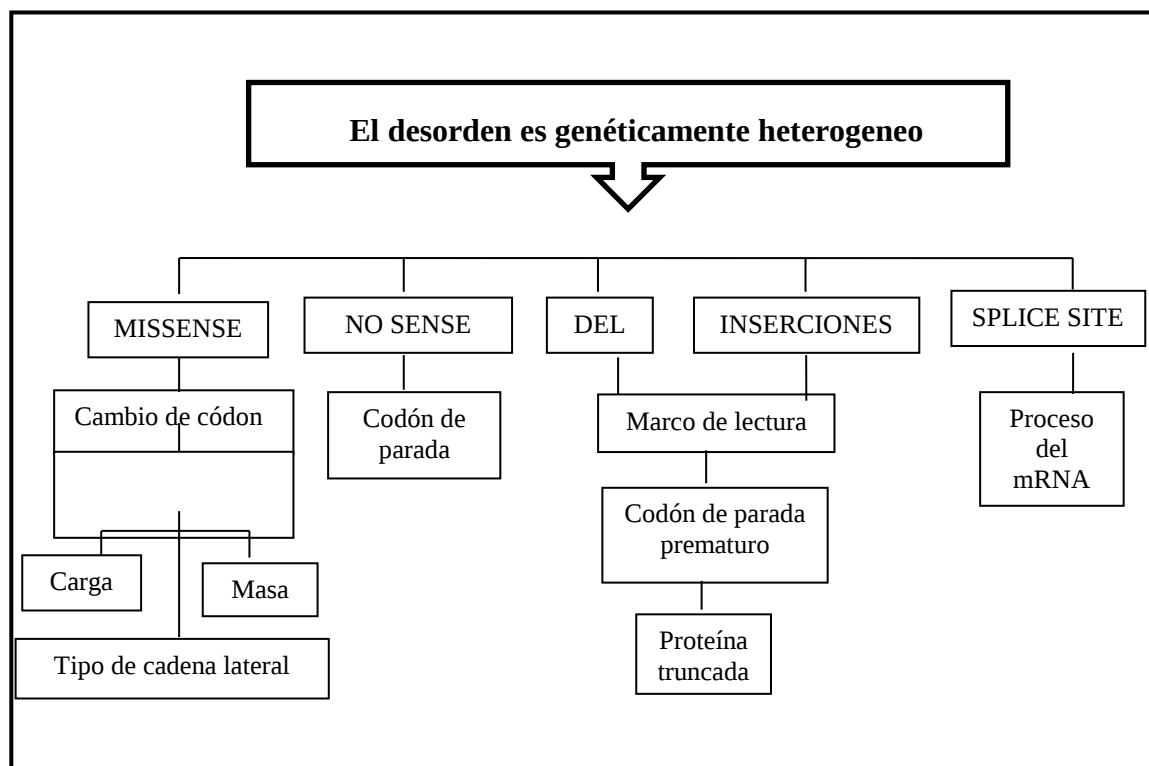


Figura 14. Tipos de mutaciones y sus efectos que producen enfermedad de Pompe (Hirschhorn, 2001, Sugawara, 2009).

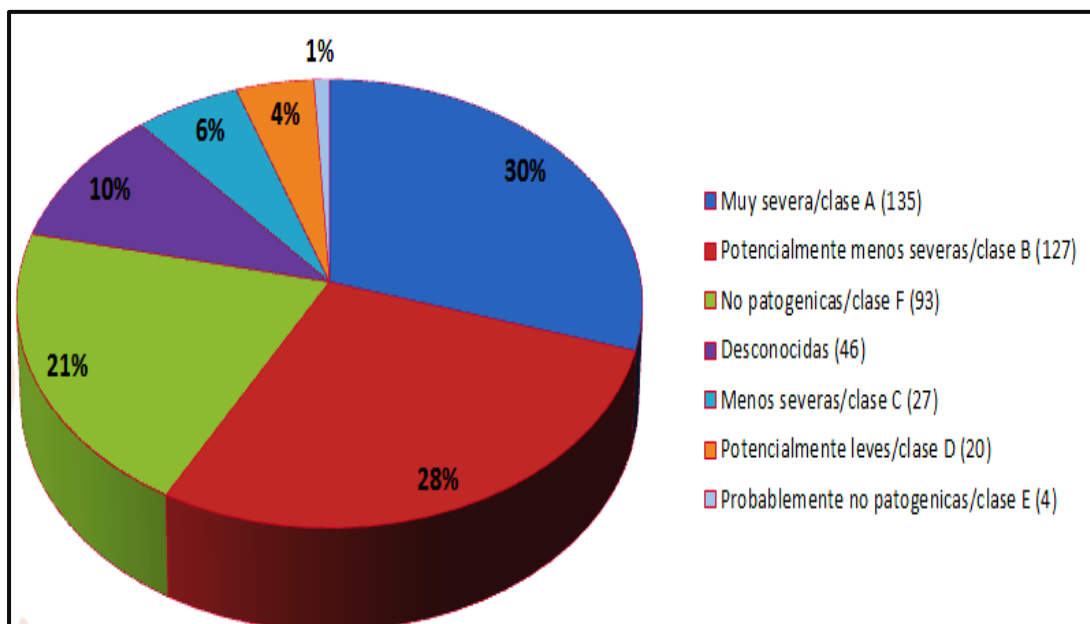


Figura 15. 452 variaciones de la secuencia de la Enfermedad de Pompe distribuidas por severidad y clase (%) (<http://www.pompecenter.nl>)

Básicamente, la naturaleza de las mutaciones en el gen de *GAA* y la combinación de alelos mutantes determinan el nivel de actividad residual de alfa-glucosidasa acida y principalmente el fenotipo clínico de la enfermedad (Hermans, 2004, Kroos, 2008, Van der Ploeg, 2008) (Cuadro 8).

La correlación genotipo-fenotipo en la EP es estricta, en la que los pacientes con el fenotipo más severo, EP infantil, tienen dos mutaciones patogénicas, una en cada alelo del gen *GAA*, que impiden la formación de *GAA* o totalmente destruye su función. Todos los pacientes con fenotipos menos progresivos tienen por lo menos una variación de la secuencia que permite la síntesis de nivel normal o bajo de *GAA* que conduce a la formación de un bajo nivel de actividad *GAA* en la mayoría de los casos (Kroos, 2007, Kroos, 2010) con una actividad residual de hasta un 23% en promedio. En esos pacientes el genotipo y la actividad enzimática no son siempre predictivos de la edad de inicio y la progresión de la enfermedad. (Kroos, 2007). Aunque, casos excepcionales han sido descritos en la literatura, tal es el caso en

pacientes descritos por Kroos et al, a quienes se les encontró dos mutaciones deletéreas con actividad enzimática residual de GAA indetectable en fibroblastos, a ellos se les diagnóstico EP infantil de acuerdo con los resultados enzimáticos y moleculares, sin embargo este diagnóstico fue realizado a la edad de 6 años al momento de la descripción (Kroos, 2004).

Hay una tendencia general de búsqueda de mayores niveles enzimáticos de GAA en pacientes con inicio de síntomas en la edad adulta, en comparación con los pacientes que presentan manifestaciones clínicas en la primera infancia, entre las edades de 0-5 años, con un curso rápidamente progresivo, pero que carecen de las características severas de EP infantil. Sin embargo, varios casos han sido reportados con EP tardía con actividad de GAA muy bajo, que en todos los casos corresponde con el genotipo de GAA (Kroos, 2010).

La diversidad clínica observada en un grupo de pacientes con el mismo genotipo de GAA y el mismo haplotipo relacionado a la mutación c.-32-13T>G demuestra que factores modificadores pueden tener un efecto sustancial en el curso clínico de la EP alterando la correlación genotipo-fenotipo. El desafío actual consiste en identificar estos factores y explorar dianas terapéuticas (Kroos, 2010).

En general no siempre existe una buena correlación entre la naturaleza de las mutaciones, el grado de enzima residual activa, y severidad de la presentación clínica, pues a pesar de un genotipo común, los pacientes presentan una amplia variabilidad en la actividad enzimática residual, edad de aparición de los signos clínicos, y la tasa de progresión de la enfermedad, sugiriendo que otros factores genéticos/medio-ambientales pueden modular la presentación clínica (Kroos, 2007, Pittis, 2008, Kroos, 2010), como consecuencia de esto, no se puede decir que hay una verdadera y clara correlación Genotipo-Fenotipo en la EP.

Cuadro 8. *Heterogeneidad Genética y clínica en Enfermedad de Pompe*. El nivel de actividad residual de α -glucosidase ácida lisosomal determina el fenotipo clínico de la enfermedad (Hermans, 2004, Kroos, 2008, Van der Ploeg, 2008).

Genotipo <i>Mutacion</i>	Fenotipo <i>actividad enzimática</i> <i>residual</i>	Enfermedad de Pompe <i>Subtipos</i>
2x mutaciones severas	0-2%	Severa - menos Severa
mutacion severa+ mutation leve	2-25%	Menos severa – Leve
2x mutationes leves	más del 25%	Leve – Saludable

1.9.1 Rango de formato por severidad

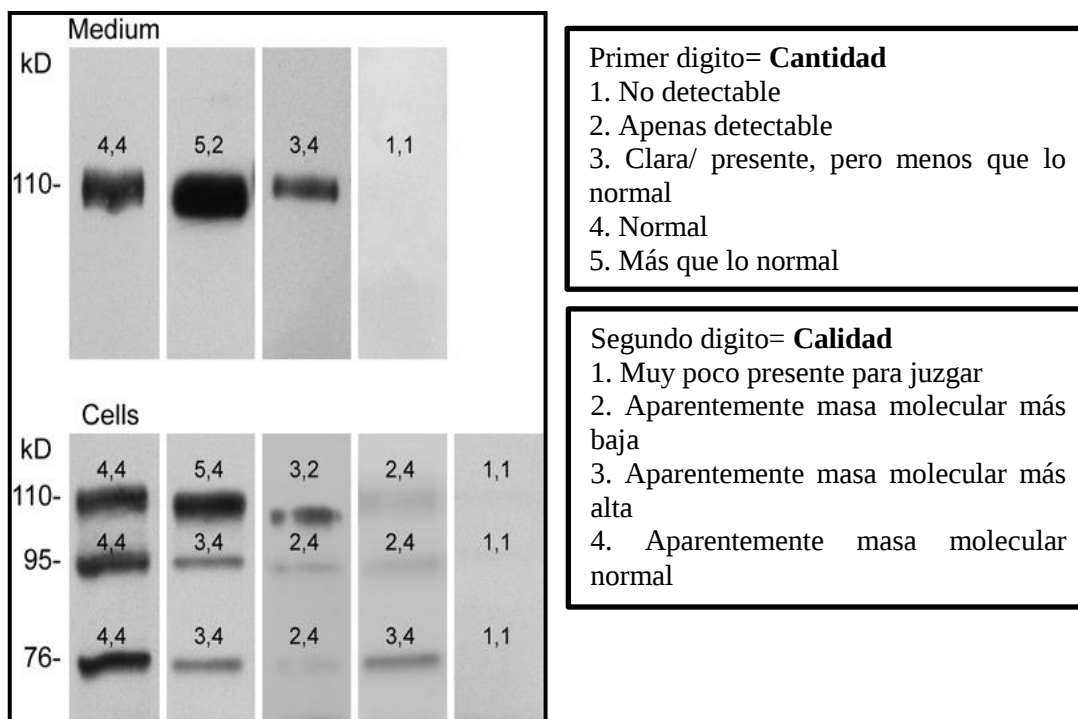
La heterogeneidad clínica es ampliamente explicada por el tipo de severidad de las mutaciones en el gen *GAA*, lo que se trata de analizar en un artículo publicado por Kroos, et, al, donde se describe una herramienta que permite clasificar las variaciones de la secuencia en el gen *GAA* por rango de severidad, con el fin de ayudar a mejorar el entendimiento de la correlación genotipo-fenotipo y facilitar el pronóstico en la enfermedad de Pompe (Kroos, 2008).

El sistema se basa en las modificaciones post-traduccionales que sufre el precursor de la proteína de 952 aminoácidos: la aparente masa molecular del precursor intracelular (C) es de 110 KDa (C110). El transporte desde trans Golgi a los lisosomas es mediado por los receptores manosa 6-fosfato. Algo de alfa-glucosidasa ácida nuevamente formada no alcanzan los lisosomas pero es secretado en el medio de cultivo (M) y tiene una masa molecular de aproximadamente 110 KDa (M110). El pool intra-celular de moléculas precursoras es modificado por procesamiento proteolítico antes o justo después de entrar en los lisosomas. Esto resulta en la

formación de un precursor intermedio de 94 KDa (C95), y las formas maduras de 76 KDa (C76 y 70 KDa). Los grandes y pequeños fragmentos son visibles como formas separadas en electroforesis de gel de poliacrilamida bajo circunstancias de denaturación (SDS-PAGE) seguido de wester blotting.

La cantidad y calidad de las formas moleculares expresadas en células transfectadas con el mutante son comparadas con las formas normales de cDNA de alfa glucosidasa acida humana recombinante y visualizadas por la cantidad y movilidad en SDS-PAGE, son en parte informativas para la severidad de las variaciones de la secuencia de *GAA*. La actividad de la alfa glucosidasa acida en esas células transfectadas proporciona información directa sobre el efecto funcional de las mutaciones. La combinación de los datos lleva a un rango de severidad para cada variante de acuerdo al siguiente esquema: las formas de 110 KDa, 95 KDa y 76 KDa se presentan después de SDS PAGE e inmunoblotting dando un rango de 2 dígitos: uno para cantidad y uno para calidad. Los siguientes esquemas dan un ejemplo de cómo la cantidad y la calidad de las formas moleculares son evaluadas (Cuadro 9)

Cuadro 9. *Rango de formato por severidad de las formas moleculares de GAA en medio y en células*



La actividad de GAA en células (C%) y medio (M%) son expresadas como porcentaje de actividad expresada en células COS-7 transfectadas con el Wild type después de la resta de la actividad de células mock. El rango de severidad de las variantes de la secuencia es basado tanto del porcentaje de actividad residual como de la cantidad y calidad de formas moleculares expresándose con letras de la A (muy severa) a la F (no patogénica) como se describe en la figura 16

Figura 16. *Rango de severidad y clasificación de las variantes.* Basado tanto en el porcentaje de actividad residual como en la cantidad y calidad de formas moleculares (Modificado de Kroos, 2008)

A Muy severa						
M110	C110	C95	C76	M %	C %	Class
1,1	1,1	1,1	1,1	0-2	0-2	A
B Potencialmente menos severa						
M110	C110	C95	C76	M %	C %	Class
>= 1,1	>= 2,4	>= 1,1	>= 1,1	0-2	0-5	B
C Menos severa						
M110	C110	C95	C76	M %	C %	Class
=>1,1	>=2,4	>=2,4	>2,4	0-10	2-10	C
D Potencialmente leve						
M110	C110	C95	C76	M %	C %	Class
>=2,4	>=3,4	>=3,4	>=3,4	5-30	5-30	D
E Presumiblemente no patogénica						
M110	C110	C95	C76	M %	C %	Class
>=4,4	>=4,4	>=4,4	>=4,4	30-60	30-60	E
F No patogénica						
M110	C110	C95	C76	M %	C %	Class
>=4,4	>=4,4	>=4,4	>=4,4	>60	>60	F

1.10 MUTACIONES POR ORIGEN ÉTNICO

La mayoría de las mutaciones son privadas, pero algunas han sido comúnmente encontradas en grupos (subgrupos) étnico- específicos. Ahora se sabe que c.2560C>T (p.Arg854X) es frecuente en afro-americanos provenientes del norte de África (Becker, 1988, Raben, 2002), y c.1935C>A (p.Asp645Glu) entre asiáticos (Ko, 1999). Las mutaciones más comunes entre pacientes caucásicos incluyen c.2481_102_2646_31del (delexon18; p.G828_N882del), c.525del (delT525;

p.E176fsX45), que se asocian a la variante infantil, (van den Hout, 2003) y c.925G>A (p.G309R) (Hirschorn, 2001; Kross, 2007). La mutación más común entre caucásicos adultos y niños con un curso lentamente progresivo de la enfermedad es c.-32-13T>G en el intron 1, que reduce la fidelidad del splicing de GAA-mRNA. (Huie, 1994; Boerkoel, 1995), Finalmente, las mutaciones p.Ser529Val y p.Arg672Gln son comunes entre pacientes japoneses y se asocian con la variante de inicio tardío (Hermans, 2004) (Cuadro 10).

Cuadro 10. *Mutaciones comunes en determinados grupos étnicos en enfermedad de Pompe* (Hirschhorn, 2001)

Mutación	Grupo Étnico	Frecuencia Alélica	Fenotipo	Autor
.Asp645Glu	Taiwaneses	0.8	Infantil	Ko TM, 1999
.Arg854X	Afroamericanos	0.5	Infantil	Becker J.A, 1988,Raben N,2002
del525T	Holandeses	0.34	Infantil	van den Hout HM, 2003
delexón 18	Holandeses	0.23	Infantil	van den Hout HM, 2003
c.-32-13T>G	Caucasicos	0.4-0.6	Tardio	Huie ML, 1994; Boerkoel CF, 1995

1.11 DIAGNÓSTICO

1.11.1 Diagnóstico Clínico Los dos subtipos de la EP difieren en la edad de inicio y características clínicas de EP. La de inicio Infantil es sospechada en infantes con las siguientes características (van den Hout, et al 2003, Kishnani,P.S. 2006; Tinkle, B.T., 2010):

-Dificultad de alimentación/retraso en el crecimiento (44%-97% de casos)

- Petraso motor/debilidad muscular (20%-63%)
- Problemas respiratorios (infecciones/dificultad) (27%-78%)
- Problemas cardiacos (acortamiento del intervalo PR, cardiomegalia, obstrucción del ventrículo izquierdo, miocardiopatía) (50% -92%)

Los cambios en las características del ECG indican acelerada conducción atrioventricular y puede ser considerada diagnostico de EP (Ansong AK, 2006)

EP de inicio Tardío es sospechado en individuos con debilidad muscular proximal e insuficiencia respiratoria sin compromiso cardiaco.

1.11.2 Test no específicos que soportan el diagnostico de Enfermedad de Pompe

1.11.2.1 Concentración de Creatinin Kinasa (CK) en suero. Se encuentra elevada (> 2000UI/L, normal: 60-305UI/L) en la EP infantil, y en la variante de la primera infancia y juvenil pero puede ser normal en EP de inicio tardío (Laforet, 2000, Kishnani, 2006). Sin embargo, la CK en suero esta elevada en varias condiciones y puede ser considerada no específica.

1.11.2.2 Oligosacaridos Urinarios. La elevación del tetrasacarido de glucosa (Glc4) en orina ha sido identificada en pacientes con EP (An, 2000). Reportes clínicos de 208 pacientes evaluados por Youn SP et al, tuvo una sensibilidad del 94% y una especificidad del 84%, mostrando ser un excelente marcador biológico que se correlaciona con el grado de acumulo de glucosa en musculo esquelético, aunque no informa acerca de la localización y distribución del exceso de glucogeno (Young, 2012). Como biomarcador muestra correlacionarse bien con la respuesta clínica a TRE (An, 2005)

1.11.3 Test usados para establecer el diagnostico de Enfermedad de Pompe

1.11.3.1 Actividad Enzimatica de Alfa glucosidasa acida (GAA). El análisis de la enzima GAA puede realizarse en muestras de sangre seca sobre papel filtro, la medición de la actividad de alfa glucosidasa acida con un mínimo de interferencia por otras alfa glucosidasas es realizado usando maltosa como inhibidor (Chamoles, 2004, Zhang, 2006), permitiendo así, un análisis rápido y sensible el cual ha sido desarrollado con la idea subyacente de implementarla en programas de screening en neonatos (Li, 2004).

La confirmación mediante la medición de la actividad de GAA en otro tejido (por ejemplo, cultivo de fibroblastos de piel) o el análisis molecular se recomienda históricamente, la medición de actividad de la enzima GAA se ha realizado utilizando cultivos de fibroblastos de la piel, pero puede tomar de cuatro a seis semanas para obtener resultados, y el retraso en el diagnóstico y el inicio del tratamiento, sobre todo en los lactantes, puede afectar el resultado.

-La completa deficiencia (actividad <1%) de actividad enzimática de GAA es asociada a EP Infantil

-La deficiencia parcial (actividad 2%-40%) de actividad enzimática de GAA es asociada con EP infantil no clásica y EP de inicio tardío (Hirschhorn R, 2001).

Sin embargo, esta correlación no es tan precisa, existen casos reportados con variantes de inicio tardío y actividad de GAA < 1% en fibroblastos de piel. (Kishnani, 2006)

Como regla general, (1) menor será la actividad de la enzima GAA a más temprana edad de aparición de la enfermedad. (2) la actividad de la enzima GAA puede tomarse a partir de músculo, sin embargo, este procedimiento invasivo por lo general requiere de anestesia, lo cual no puede ser tolerada en aquellos pacientes con EP y con compromiso cardiopulmonar. (3) leucocitos periféricos se han utilizado para

medir la actividad de la enzima GAA pero isoenzimas alternativas tales como la maltasa-glucoamilasa puede interferir con el ensayo. (4) el análisis de la actividad de la enzima GAA se puede realizar en muestras de sangre seca (Chamoles, 2004, Zhang, 2006), lo que permite un análisis rápido y sensible que es potencialmente útil para la evaluación del recién nacido (Kishnani, 2006).

El diagnóstico clínico de la enfermedad de Pompe es tradicionalmente confirmado por la virtual ausencia (inicio infantil) o marcada reducción (inicio tardío) de la actividad de la enzima alfa-glucosidasa acida en tejidos como cultivo de fibroblastos a partir de biopsia de piel, biopsia muscular, linfocitos purificados, células linfoides mononucleadas. Sin embargo, históricamente la medida enzimática de GAA es más fiable realizarla en cultivo de fibroblastos o biopsia de musculo debido a la posibilidad de la actividad alterna de la isoenzima (maltasa glucoamilasa), enmascarando la enfermedad en ensayos con leucocitos. La alfa-glucosidasa acida tiene una actividad optima a pH 3.7-4.5 e hidroliza los enlaces alfa 1-4 y 1-6 a polimeros de glucosa. En un típico ensayo la actividad de GAA es medida a pH acido (3.7-4.5) y comparada con la actividad de la glucosidasa neutra a pH 7.0 usando maltasa y glucógeno o un análogo sintético fluorescente de maltosa, 4-methylumbelliferyl-alpha-D-glucopiranosido (4-MUG) como substratos. (Whitaker, 2004, Kishnani, 2006).

El método para la valoración de GAA involucra un protocolo modificado a partir del ensayo de Chamoles et al, (Chamoles, 2004) usando 4 metillumbeliferil-alfa-D-glucopiranosido (4-MUG) como substrato y acarbosa como un potente inhibidor para alfa-glucosidasas presentes en granulocitos que no están relacionadas con la enfermedad de Pompe. El estudio permite obtener tres expresiones de actividad enzimática así: Actividad de Alfa Glucosidasa total a pH: 3,8, Actividad de Alfa Glucosidasa Inhibida a pH: 3,8 en presencia de Acarbosa 120 uM y Alfa glucosidasa Neutra total a pH: 7.0. Se uso como Buffer Acetato de Sodio 0,4 M. La actividad final para cada Fracción se obtiene en nM/mgProt/Hora.

Cuando el glucógeno es usado como sustrato, la discriminación de pacientes y rangos control mejora, pero la completa separación se obtiene cuando la acarbosa es incluida en el ensayo, para inhibir la maltasa-glucoamilasa (Okumiya, 2006).

El material de elección y el método Gold estándar para el diagnóstico de Pompe es el cultivo de fibroblastos obtenidos a partir de biopsia de piel. El análisis en fibroblastos usando sustrato artificial 4-MUG es muy sensible (Hirschhorn, 2001), además porque los fibroblastos no contienen maltasa-glucoamilasa, las desventajas de este método se debe a que es un método invasivo y además toma varias semanas para obtener un cultivo confluyente (Winchester, 2008).

La mezcla de leucocitos a partir de muestras de sangre, es uno de los actuales métodos que están siendo implementados debido a que es un método mínimamente invasivo y de fácil recolección, necesita pocos pasos de preparación comparada con la de linfocitos purificados usa acarbosa para eliminar la interferencia de la maltasa glucoamilasa, pero tiene como limitante el tiempo de procesamiento, el cual no debe ser superior a dos días, ya que esto reduce la actividad enzimática.(Winchester, 2008)

Los linfocitos purificados a partir de muestras de sangre, es otro método de elección no invasivo, por medio de inhibición competitiva; la purificación requiere preparaciones adicionales. La inclusión de acarbosa es recomendada para eliminar la interferencia de maltasa glucoamilasa previniendo resultados falsos negativos a partir de contaminación de neutros (Winchester, 2008).

1.11.3.2 Cuantificación proteica de alpha glucosidasa acida. Puede ser realizado por un método basado usando anticuerpos en cultivo de fibroblastos. Como test puede ser importante en determinar si un individuo afectado produce material inmunológico con reactividad cruzada (CRIM). El estatus del CRIM afecta la respuesta al tratamiento de TRE e individuos con CRIM negativo pueden necesitar un reajuste en el plan de la terapia enzimática (Kisnani, 2010).

1.11.3.3 Biopsia Muscular. En la EP se puede observar los lisosomas de las células musculares como vacuolas de diversa severidad que se tiñen positivamente con el ácido periódico de Schiff. Sin embargo, el 20% -30% de las personas con EP de aparición tardía con deficiencia con deficiencia enzimática parcialmente documentada no pueden mostrar estos cambios específicos del músculo (Laforet, 2000, Winkel, 2005).

A pesar de que la biopsia muscular es buena fuente de material para medir la actividad de la enzima, este método no es muy sensible debido a pérdida de actividad en transporte y procesamiento de la muestra, además la toma de la biopsia muscular requiere anestesia lo que representa un riesgo para el paciente. (Winchester, 2008).

1.11.3.4 Tamizaje Neonatal. La justificación del tamizaje neonatal es que los niños con casos confirmados con EP de inicio Infantil que se tratan a tiempo con TRE han mostrado un mejoramiento en el estado cardíaco y el status del sistema motor, en comparación con los controles (Chien, 2009). El tamizaje neonatal para EP, usando la actividad de la enzima GAA en gotas de sangre seca sobre papel filtro como herramienta de tamizaje primario, ha sido estudiado en Taiwan. Las variantes asociadas con EP de inicio temprano y tardío han sido identificadas en esta población. Chen, et al, condujeron un programa piloto de tamizaje neonatal en Taiwan entre octubre 1 del 2005 y diciembre 31 de 2007, a un 45% aproximadamente de todos los neonatos en Taiwan se les realizó medición de la actividad de GAA en gotas de sangre seca, con el fin de mejorar la detección precoz de la EP.

La actividad de la enzima menor al 55% de la media de la población fue reevaluada, como también la actividad de glucosidasa neutra (NAG) en gotas de sangre seca. Cuando la proporción NAG/GAA fue mayor a 100, el neonato fue reevaluado inmediatamente para un test confirmatorio en gotas de sangre seca, de otra forma cuando la actividad de GAA fue menor a 25% y la proporción de NAG/GAA fue mayor a 25%, un segundo análisis en gotas de sangre seca fue obtenido y analizado.

Cuando en el segundo test la actividad fue menor a 8% y la proporción NAG/GAA fue mayor a 60 y el porcentaje de inhibición de GAA total fue mayor a 80%, el infante fue referido para el diagnóstico de confirmación vía ensayo de actividad de GAA en sangre y para evaluación clínica.

Seis de 206.088 recién nacidos dieron positivo y fueron tratados para la EP. Cinco tenían la forma rápidamente progresiva de EP, caracterizada por compromiso cardíaco y motor, quienes fueron tratados poco después del diagnóstico. Al sexto paciente se le inició tratamiento a los 14 meses de edad debido a la debilidad muscular progresiva.

Los resultados fueron comparados con pacientes tratados cuya enfermedad era diagnosticada clínicamente y con los sujetos de control no tratados. Los pacientes fueron tratados de 14 a 32 meses. Los cinco infantes quienes desarrollaron compromiso cardíaco demostraron normalización del tamaño cardíaco y la patología muscular con crecimiento físico normal y ganancia apropiada para la edad en el desarrollo motor. El infante sin compromiso cardíaco también logró un desarrollo motor normal con el tratamiento. La supervivencia en pacientes a quienes se les realizó tamizaje neonatal fue significativamente mejor comparada con la corte de referencia que no recibió tratamiento ($p=0,001$). Los resultados de este estudio indican que el tratamiento temprano puede beneficiar a los neonatos con EP y poner de manifiesto las ventajas del diagnóstico temprano, lo cual puede ser logrado con el tamizaje neonatal (Chien, 2009)

Hay que tener presente que la pseudodeficiencia del alelo c.1726G> A (p.Gly576Ser), que es relativamente común en las poblaciones de Asia, complica la evaluación y la confirmación del diagnóstico en estas poblaciones. Queda por ver si esa pseudodeficiencia es común en otras poblaciones. (Labrousse, 2010)

1.11.3.5 Test Genético Molecular. El análisis de las mutaciones, tiene un importante uso, a pesar de que el análisis de actividad enzimática es el test diagnóstico de elección. Esto es particularmente útil en la identificación de portadores donde una mutación familiar es conocida. Hay también algunas mutaciones comunes con utilidad ya que proporcionan información para poder establecer una correlación genotipo-fenotipo, aunque muchas son menos específicas o son infrecuentes, las cuales entonces son menos útiles en ese contexto (Raben N, 2002; Van der Kraan M, 1994). Adicionalmente el análisis de las mutaciones pueden ser útil en el diagnóstico; solo en poblaciones específicas, por ejemplo p.R854X en Afriano-Americanos, y p.D645E en población China (Di Rocco, 2007).

1.11.3.6 Gen. GAA es el único gen conocido por estar asociado con EP

Análisis molecular

Análisis de la secuencia. Dependiendo de la etnicidad y el fenotipo un individuo puede ser analizado primero para una de las tres mutaciones comunes p.Asp645Glu, p.Arg854X, y c.-32-13T>G antes de proceder a un completo análisis de toda la secuencia del gen GAA.

El 83%-93% de los individuos con confirmación reducida o ausencia de la actividad enzimática de GAA, dos mutaciones pueden ser detectadas por secuenciación genómica del ADN. (Hermans, 2004; Montalvo, 2006)

Análisis de delección/duplicación. Una de los más comunes alelos patogénicos involucra la delección del exón 18, visto en aproximadamente 5%-7% de los alelos (van der Kraan, 1994).

Cuadro 11. *Resumen del Test Genético Molecular usado en Enfermedad de Pompe*

Símbolo del Gen	Método del test	Mutaciones detectadas	Frecuencia de detección de la mutaciones por Test
<i>GAA</i>	Análisis de la secuencia	p.Arg854X p.Asp645Glu c.-32-13T>G otras variantes de la secuencia ⁴	50-60% ¹ 40-80% ² 50-85% ³ 83-93% ⁵
<i>GAA</i>	Análisis de Delección/duplicación ⁶	Delección/duplicación exonica y todo el gen	5-13%

1. En Afroamericanos con EP de inicio Infantil (Becker, 1998, Hirschhorn, 2001), 2. En individuos de ancestría China con EP de inicio Infantil (Ko, 1999, Hirschhorn, 2001), 3. En adultos con EP de inicio Tardío, típicamente esta mutación ocurre en estado heterocigoto compuesto (Laforet, Hirschhorn, 2001, Montalvo, 2006; Winkel, 2005), 4. Ejemplo de mutaciones detectadas por análisis de la secuencia que incluye delecciones/inserciones intragenicas pequeñas, mutaciones missense, nonsense y en el sitio de splicing, 5. tasa de detección de dos mutaciones por medio de secuenciación del ADN genómico en pacientes con confirmación de actividad reducida o ausente de GAA (Hermans, 2004 Montalvo, 2006), 6. Los Test que identifican delecciones/duplicaciones no es detectable por análisis de la secuencia del ADN genómico; una variedad de métodos incluyen PCR cuantitativo, long-range PCR, MLPA entre otros. (Modificado de Tinkle, 2010)

1.11.4 Estrategia del Test

Confirmar/establecer el diagnostico en un probando. Pautas para el diagnóstico de la enfermedad de Pompe ha sido presentado por un panel de expertos del Colegio Americano de Genética Médica. (Kishnani, 2006).

La sola evaluación clínica no es suficiente para establecer el diagnostico de cualquier forma de EP:

-Los ensayos de actividad enzimática de GAA en cultivo de fibroblastos o musculo, son considerados el Gold estándar para el diagnostico de EP, es el test de diagnostico de elección, pero puede tomar varias semanas en obtener resultados

-El ensayo de actividad enzimática de GAA en papel filtro detecta deficiencia de la enzima GAA, este método es preferido previo a la iniciación de TRE.

-Los niveles de tetrasacaridos urinarios se encuentran elevados en aproximadamente 100% de los individuos con EP, pero puede ser normal en EP de inicio tardío.

-La evidencia histoquímica de almacenamiento de glucógeno en musculo soporta desorden de almacenamiento de glucógeno pero no es especifica de EP.

-La identificación de dos alelos GAA causantes de la enfermedad usando test genético molecular proporciona confirmación adicional del diagnóstico.

1.12 TRATAMIENTO

Esta entidad debe ser manejada por un equipo multidisciplinario coordinado por un especialista, los miembros del equipo deben incluir un genetista, y los especialistas que puedan tratar el resto de manifestaciones, a quienes se pueden incluir un

cardiólogo, neumólogo, neurólogo, fisiatra, cardiólogo, terapeuta respiratorio, terapeuta físico, terapeuta ocupacional y terapeuta del lenguaje principalmente.

Todos los especialistas que están involucrados en el cuidado del paciente deben tener un buen entendimiento de la enfermedad, sus amplias manifestaciones, los cambios especiales incluyendo el efecto psicológico que genera esta desbastadora enfermedad sobre el paciente incluyendo su familia (Figura 17)

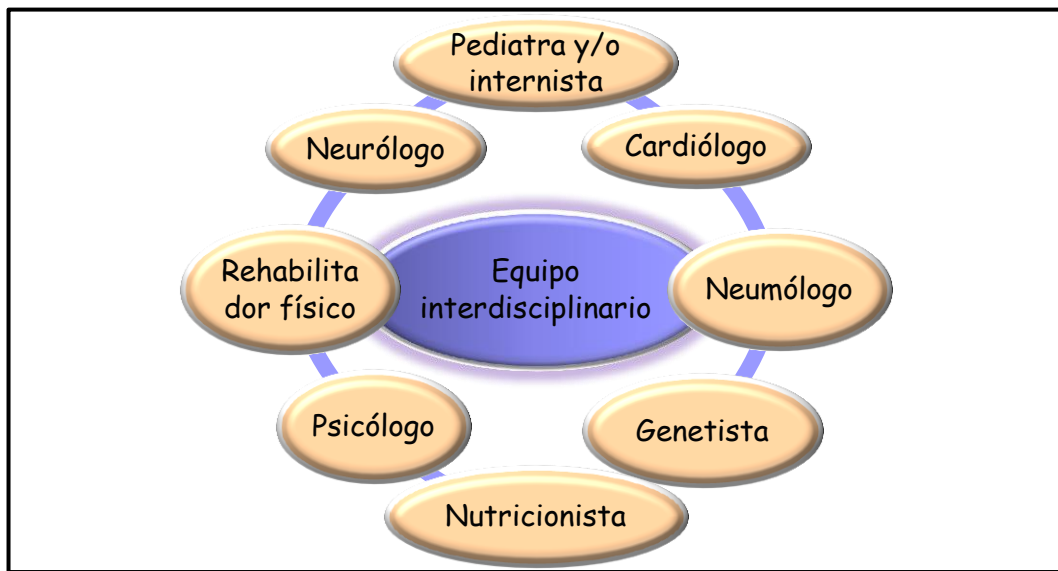


Figura 17. *Especialistas involucrados en el tratamiento en la enfermedad de Pompe*

Actualmente el tratamiento para GSDII tiene uno de sus pilares fundamentales en la terapia de remplazo enzimático (TRE), la cual está siendo implementada con gran éxito, esta también la terapia génica, actualmente bajo estudio, pero que en un futuro augura prometedores resultados.

En el pasado se intentó el trasplante de médula ósea, sin embargo se observó que no hubo incremento en la actividad de α glucosidasa ácida en los músculos y fibroblastos de los pacientes tratados. (Watson, 1986).

1.12.1 Terapia génica

El fundamento de la terapia génica es introducir el gen que codifica la enzima deficiente dentro de células somáticas, creando una fuente permanente de la enzima. La secuencia que codifica para la enzima alfa glucosidasa acida es insertada en vectores virales. La terapia génica en la EP ha usado vectores adenovirales (Ad), virus adeno-asociados (AAV) e híbridos de vectores Ad-AAV, los cuales han sido investigados en ratas, ratones y codorniz. (Pauly, 1998; Sun, 2003).

La inyección intramuscular con vectores Ad y AAV lleva a un fuerte incremento en la actividad de alfa glucosidasa acida y corrección de almacenamiento de glucógeno en los músculos, pero solo en el sitio de inyección (Pauly, 1998; Tsujino, 1998; Lin, 2002). La inyección intramuscular con híbridos de vectores Ad-AAV en los músculos gemelos de ratones recién nacidos, sin embargo, mostro niveles terapéuticos de GAA en los músculos adyacentes y bajos niveles de actividad de GAA en corazón (Sun, 2003). En los últimos ensayos se han usado virus adeno-asociados, logrando mejores resultados en las características del tejido blanco y en la expresión de GAA en el hígado, y adicionalmente, corrección en el corazón y musculo (Franco, 2005; Sun, 2005). Enconjunto, los resultados de los test de la terapia génica son prometedores, pero la expresión prolongada del gen, la prevención de formación de anticuerpos contra vectores virales y/o GAA y la seguridad de los vectores son todavía problemas por solucionar.

1.12.2 Tratamiento nutricional

Otra aproximación en el tratamiento de la EP es la adherencia a una dieta alta en proteínas o una dieta suplementada con aminoácidos de cadena ramificada. La explicación de esta dieta se basa en que el desglose de proteínas esta incrementado en pacientes con enfermedad de Pompe (Umpleby, 1987; Slonim, 1983; Bodamer, 1997). Se ha sugerido que esto se debe a una alteración del metabolismo de los

carbohidratos, causando en el musculo el uso de proteínas como fuente alternativa de energía (Slonim, 1983); pero una explicación más probable es el incremento de tejidos dañados causado por la severa alteración de la arquitectura celular y la liberación de enzimas proteolíticas después de la ruptura de los lisosomas hinchados (Umpleby, 1987).

Una dieta alta en proteínas incrementa el pool de aminoácidos disponible para la síntesis de proteínas y por consiguiente contrarresta la degradación de proteínas musculares, suplementando la dieta normal con L-alanina podría tener un efecto comparable. La L-alanina disminuye la ruptura de cadena de aminoácidos ramificados para la producción de energía, por consiguiente ayudando a preservar la proteína muscular y función muscular (Bodamer, 2002; Bodamer, 2000).

Adicionalmente Slonim, observó que una dieta alta en proteínas, baja en carbohidratos sumada a ejercicio aeróbico, puede beneficiar a estos pacientes. La explicación a esta forma de terapia es que disminuye el depósito de glucógeno, incrementa la utilización de ácidos grasos musculares y al mismo tiempo compensa el aumento de la oxidación de aminoácidos que ocurre en la enfermedad. (Slonim, 1990, Slonim, 2006).

Sin embargo, los resultados de esos tratamientos dietéticos en la variante de inicio tardío son controversiales, pues varios estudios reportan un mejoramiento en la función muscular respiratoria o musculo-esquelética (Umpleby, 1987; Slonim, 1983), mientras otros no (Padberg, 1989).

En la EP infantil, la terapia dietética no parece ser efectiva (Slonim AE, 1986; Finegold DN, 1988), sólo el 25% de los casos mostraron una mejoría en la función muscular o en la función respiratoria después de una dieta alta en proteínas. (Bodamer, 1997).

Los estudios sobre la terapia dietética involucran principalmente reportes de casos o un pequeño número de pacientes. Se requiere la implementación de ensayos más grandes y controlados para evaluar plenamente sus efectos.

1.12.3 Terapia de remplazo enzimático (TRE)

Después de la caracterización del gen *GAA* humano, los esfuerzos fueron dirigidos a la producción de alfa glucosidasa ácida humana recombinante. Dos sistemas fueron exitosamente desarrollados: la producción de alfa glucosidasa ácida en animales transgénicos (Bijvoet, 1999) y en células de ovario de Hámster chino (células CHO) (Fuller, 1995; Van Hove, 1996). Con ambos métodos una forma precursora de la alfa glucosidasa ácida es obtenida y puede ser recolectada a partir del medio. Posteriormente, los efectos de la TRE fueron pre-clínicamente aprobados en modelos animales con EP. El suministro de la enzima recombinante producida en ratones y conejos transgénicos llevó a la normalización de la actividad de *GAA* y a la conversión del precursor de 110 KDa a la forma madura de 76-KDa en tejido muscular y cardíaco de ratones *knock out*. El glucógeno fue degradado en músculo esquelético, liso y cardíaco, pero la enzima no fue capaz de atravesar la barrera hemato-encefálica (Bijvoet, A.G., 1999). Resultados similares fueron obtenidos con la enzima recombinante derivada de células CHO que fue analizada en codornices deficientes de *GAA* (Kikuchi, 1998).

La seguridad y eficacia de la alfa glucosidasa ácida recombinante a partir de animales transgénicos y de células CHO han sido descritas en varios ensayos clínicos en pacientes con enfermedad de Pompe. El primer reporte publicado de TRE derivado de células CHO data del año 2001 y describe un ensayo en donde 3 infantes fueron tratados inicialmente con 5 mg/kg de enzima recombinante dos veces por semana (Amalfitano, 2001). A partir de entonces ensayos con seguimientos prolongados han sido desarrollados con la finalidad de evaluar y encontrar el régimen de la dosis óptima.

En un estudio realizado por Kishani, et al, se evaluó la infusión intravenosa de rhGAA a dosis: 20mg/kg o 40mg/kg en 18, pacientes con EP de inicio infantil, comparados con un grupo control histórico no tratado, en donde se encontró al final del estudio que todos los pacientes (100%) sobrevivieron a los 18 meses, mejoró la cardiomiopatía, y la función ventilatoria. El análisis de regresión de COX (clase de modelo usado para evaluar los riesgos que afectan la supervivencia de una población de sujetos) mostró que durante el periodo de estudio (tres años), el tratamiento con alfa glucosidasa redujo el riesgo de muerte en un 95%, redujo el riesgo de ventilación invasiva o muerte en un 91%, y redujo el riesgo de cualquier tipo de ventilación o muerte 87% comparado con un grupo control no tratado (Kishnani PS, 2009), en general el tratamiento prolongado de alfa glucosidasa notablemente mejora la supervivencia, la supervivencia libre de ventilación al igual que la cardiomiopatía. Esto demuestra que rhGAA es segura y efectiva para el tratamiento de la EP de inicio infantil. El inicio temprano de la terapia, inferior a los seis meses de vida, puede contribuir a una mejor respuesta en comparación con aquellos pacientes que la inician a una edad más avanzada, proporcionando una mejor tasa de supervivencia, una mejor función respiratoria, cardíaca y desarrollo motor en infantes severamente afectados. (Kishnani, 2009).

Adicionalmente, varios ensayos clínicos en pacientes con EP de inicio Infantil han mostrado que la TRE prolonga la tasa de supervivencia (Pauly, 1998; Van den Hout, 2000), disminuye la cardiomegalia y mejora la función muscular esquelética. En la gran mayoría de casos la respuesta cardíaca parece ser buena independientemente del estado de la enfermedad al inicio de TRE. La respuesta de musculo-esquelético ha sido más variable que la respuesta muscular cardíaca. La mejor respuesta musculo-esquelética ha sido notada en pacientes tratados tempranamente, previos a daño musculo esquelético severo. Otros estudios han demostrado estabilización y disminución de los síntomas respiratorios y motores en pacientes con EP de inicio tardío (Winkel, 2004, Case, 2008, Forsha, 2011).

El requerimiento de altas dosis de rhGAA para tratar la enfermedad de Pompe, casi es 10 veces superior al de otras enfermedades, posiblemente esté relacionado por un lado, con el gran volumen de tejido muscular a tratar, otro factor puede ser la baja eficiencia en tomar la enzima por el sistema muscular. Sin embargo el musculo cardiaco es mucho más eficiente en tomar la enzima que el musculo esquelético (Rabben, 2003; Wilkel, 2004).

Grandes infusiones de la proteína recombinante pueden causar varios problemas. En pacientes con EP algunos tienen predisposición a desarrollar reacciones inmunes adversas, pues se ha visto pacientes con EP CRIM (material inmunológico con reactividad cruzada) negativos; en esos pacientes el título de anticuerpos es alto. El número alto de anticuerpos está relacionado con pérdida de eficacia al tratamiento, donde el Status de CRIM es un factor de pronóstico al tratamiento de la enfermedad. Esto sugiere que ante un mejor estado clínico antes de iniciar el tratamiento mejor será el resultado (Chiein, 2007).

Pacientes tratados con TRE desarrollaron anticuerpos IgG dentro de los primeros tres meses de tratamiento. Reacciones a la perfusión parecen ser más comunes en individuos con anticuerpos IgG. El desarrollo de anticuerpos IgE es menos común pero puede estar asociada con una reacción anafiláctica. Algunos pacientes con altos títulos de IgG sostenidos pueden tener una mala respuesta clínica al tratamiento. La mayoría de estas reacciones pueden ser modificadas al disminuir la tasa de infusión o administración de antipiréticos, antihistamínicos, o glucocorticoides. Sin embargo, la anafilaxia requiere medidas de soporte vital. Por esas razones, y debido a que varias personas con EP con compromiso pre-existente de la función respiratoria y cardíaca, se recomienda la infusión en los centros equipados para brindar atención de emergencia. (Kinkle, 2010)

La terapia de remplazo enzimático (TRE) con alfa glucosidasa humana recombinante rhGAA, Myozime®) fue aprobada para el manejo de pacientes con EP en el año 2006

(Kishnani, 2009). En enero de ese año, el Comité para productos Médicos Humanos (CHMP) de la agencia de Medicina Europea (EMA) adoptó una posición positiva sobre la autorización de la comercialización de la aplicación de Myozyme®, el nombre dado a la alfa glucosidasa ácida humana recombinante derivada de células CHO para terapia de remplazo enzimático en la enfermedad de Pompe.

Previos estudios demostraron que la TRE cambia la historia natural de la enfermedad en infantes y niños (Kishnani, 2009). La razón fundamental de la terapia es tratar la enfermedad por administración intravenosa de la enzima deficiente.

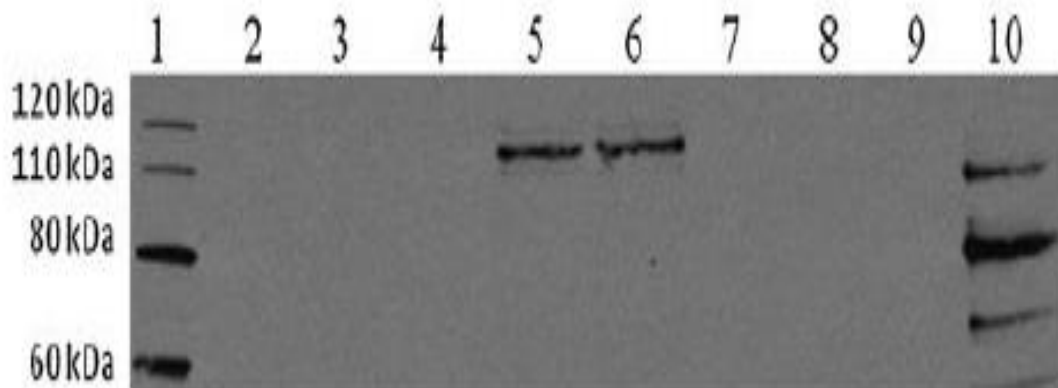
1.13 MATERIAL INMUNOLÓGICO CON REACTIVIDAD CRUZADA (CRIM)

La TRE para la EP usando alfa glucosidasa ácida recombinante (rhGAA) ha resultado en un incremento en la tasa de supervivencia, aunque la respuesta clínica es variable. El status CRIM-negativo (figura 18) ha sido reconocido como factor de pobre pronóstico de respuesta al tratamiento, siendo un importante predictor ante la respuesta clínica (Amalfitano, 2001; Kishnani, 2006, Kishani, 2010, Bali, 2012). Pacientes CRIM-negativos no toman la proteína, debido a la presencia subyacente de alelos de GAA deletados nulos y como resultado su sistema inmune reconoce la rhGAA como proteína extraña, desarrollando substancialmente títulos de anticuerpos altos ante TRE.

Aproximadamente el 20% de pacientes con EP infantil son CRIM-negativos, a pesar de haber iniciado TRE, esos pacientes usualmente no responden ante el tratamiento debido al desarrollo de títulos altos de anticuerpos neutralizantes de rhGAA haciendo el tratamiento ineficaz (Banugaria, 2011). Los pacientes CRIM-positivos, en contraste producen algo de proteína residual (figura 18), aunque una forma inactiva no funcional, ellos generalmente tienen títulos bajos de anticuerpos y una mejor respuesta clínica sin la necesidad de inmunomodulación (Bali, 2012).

Interesantemente se han reportado algunos pacientes con EP infantil CRIM-positivo han desarrollados títulos de anticuerpos altos y entonces se reduce el beneficio de la TRE similar a los pacientes CRIM-negativos. (Banugaria, 2011)

Figura 18. *Status de CRIM*: el Western blot muestra pacientes CRIM positivos, se observa síntesis de la forma molecular de 110KDa (carriles 5 y 6), en comparación con pacientes CRIM negativos donde se evidencia la ausencia total de la proteína (carriles 2, 3, 4, 7, 8, 9). Los numerales 1 y 10 corresponden al patrón de peso molecular (Bali, 2012)



Determinar el estado del CRIM permite tomar decisiones sobre terapia de inmodulación previo o poco después de haber iniciado el tratamiento (Bali DS, 2012).

En un estudio realizado por Bali, et al, se analizaron 243 pacientes con EP de inicio infantil usando western blott para determinar el estado de CRIM y cultivo de fibroblastos. 61 de los 243 (25.1%) pacientes analizados de varios grupos étnicos fueron CRIM-negativos. Adicionalmente se correlaciono los resultados del CRIM con las mutaciones en el gen GAA (n= 140 pacientes, 52 pacientes CRIM-negativos, 88 pacientes CRIM-positivos). Se encontró que en la mayoría de los casos el estado del CRIM se puede predecir a partir de las mutaciones en GAA, lo que podría evitar la necesidad de biosia de piel, y el tiempo requerido en el cultivo de células en un futuro. (Bali, 2012). Estudios adicionales en esta área ayudaran a incrementar el

poder en que las mutaciones de GAA sea predictivo del estado del CRIM, así como también la posibilidad de identificar pacientes CRIM-positivos que están en riesgo de desarrollar altos títulos de anticuerpos. (Bali, 2012)

1.14 REGISTRO DE POMPE

Se anima a los profesionales médicos a inscribir a pacientes a los que se les ha diagnosticado la enfermedad de Pompe en www.PompeRegistry.com. Los datos de los pacientes se recopilarán de forma anónima en este Registro. Los objetivos del “Registro Pompe” son aumentar la comprensión de la enfermedad de Pompe y controlar a los pacientes y su respuesta a la terapia de sustitución enzimática en función del tiempo, con el objetivo final de mejorar los resultados clínicos para estos pacientes.

2. JUSTIFICACIÓN

La EP es una enfermedad de depósito lisosomal con una relativa baja frecuencia a nivel mundial. Sin embargo, la reciente disponibilidad de una terapia eficiente de reemplazo enzimático que mejora de manera considerable el pronóstico para los afectados, ha llevado a un creciente interés en el diagnóstico. En Colombia, en los últimos 10 años se han diagnosticado 13 pacientes con EP, sin embargo, a ninguno de ellos se le había realizado el estudio molecular. El conocimiento de la mutación es importante ya que permite establecer un curso predictivo de la enfermedad a través de la correlación con el fenotipo, identificar portadores, lo cual no es posible a través de las pruebas de actividad enzimática y realizar un adecuado asesoramiento genético al paciente y a sus familias.

Actualmente, existe una controversia sobre la correlación genotipo-fenotipo en la EP pues por un lado se ha visto que los pacientes con el fenotipo más severo, EP infantil, tienen dos mutaciones patogénicas, que impiden la formación de GAA o altera totalmente su función, mientras que los pacientes con fenotipos menos severos tienen por lo menos una mutación que lleva a una disminución parcial de la actividad. Sin embargo, en la mayoría de los casos, en esos pacientes el genotipo y la actividad enzimática no son siempre predictivos de la edad de inicio y la progresión de la enfermedad. En general no siempre existe una buena correlación entre la naturaleza de las mutaciones, el grado de enzima residual activa, y la severidad de la presentación clínica, pues a pesar de un genotipo común, los pacientes presentan una amplia variabilidad en la actividad enzimática residual, edad de aparición de los signos clínicos, y la tasa de progresión de la enfermedad.

En Colombia este análisis nunca ha sido abordado, es por ello que en este estudio se pretende evaluar el perfil clínico, genético y la frecuencia mutacional de los individuos afectados con EP, para lograr establecer o no, una correlación genotipo-fenotipo de la enfermedad y compararla con lo reportado en la literatura.

Por otro lado, recientemente se ha reportado que algunos pacientes desarrollan una respuesta inmunológica cruzada a lo que se conoce como el estado del CRIM. Este es un importante predictor de la respuesta clínica al tratamiento, pero para su análisis es necesario tomar una biopsia de piel y cultivo celular. A través de la identificación de la mutación se puede predecir el estado de CRIM evitando estos procedimientos invasivos y permitiendo la toma de decisiones sobre la terapia de reemplazo enzimático.

Todo esto en conjunto ayuda a crear y fomentar conocimiento de la EP en Colombia y permitirá brindar una intervención médica temprana y multidisciplinaria a los afectados, así como un adecuado asesoramiento genético a estos y sus familias.

3. PLANTEAMIENTO Y FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

La EP es una entidad con herencia autosómica recesiva producida por mutaciones en el gen *GAA*. Se ha estimado que la EP tiene un amplio espectro mutacional con cerca de 400 mutaciones descritas, la mayoría de ellas privadas ó presentes en un pequeño número de pacientes. De igual manera se resalta una amplia variación regional y étnica del comportamiento mutacional, lo que hace necesario que estos se realicen para cada población en particular, logrando categorizar el tipo de mutaciones más frecuentes en cada población y reportar la existencia de nuevas mutaciones.

La determinación de mutaciones en los pacientes afectados a su vez, permitirá la identificación de portadores y de nuevos casos en sus familias, lo cual contribuirá al establecimiento de medidas como asesoría genética y screening prenatal, entre otros, que permitirá mejorar la calidad de vida de los pacientes, al igual que la de su entorno familiar.

Este estudio pretende resolver la pregunta:

¿Cuáles son las implicaciones clínicas y moleculares de las mutaciones presentes en los pacientes Colombianos afectados con enfermedad de Pompe?

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Identificar las mutaciones presentes en los pacientes Colombianos con enfermedad de Pompe y caracterizarlas desde el punto de vista clínico y funcional.

4.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Identificar las mutaciones que presentan los pacientes colombianos con diagnóstico confirmado de Enfermedad de Pompe.
- Establecer una correlación genotipo-fenotipo entre las mutaciones identificadas y el cuadro clínico presente en los pacientes analizados.
- Caracterizar los efectos generados por las mutaciones nuevas sobre la actividad y la función de la enzima por medio de análisis funcionales.
- Establecer mediante análisis de haplotipos, el posible origen étnico de las mutaciones más frecuentes en los pacientes colombianos con Enfermedad de Pompe.
- Comparar la distribución de las frecuencias mutacionales en los pacientes Colombianos con otros países a nivel mundial.

5. ASPECTOS METODOLÓGICOS

5.1 TIPO DE ESTUDIO

Estudio de corte transversal, descriptivo.

5.2 POBLACIÓN DE REFERENCIA Y MUESTRA

Se incluyeron todos los pacientes colombianos con un diagnóstico confirmado de enfermedad de Pompe basado en la clínica y en la medición de la actividad enzimática en Leucocitos, que hayan sido remitidos para su estudio a la unidad de Genética de la Universidad del Rosario.

Se recibieron un total de 13 afectados, provenientes de nueve familias, con diagnóstico deEP realizada en los últimos 10 años, que corresponden a la totalidad de los pacientes diagnosticados en Colombia a la fecha de inicio del estudio.

5.2.1 Criterios de inclusión

- Pacientes con un diagnóstico clínico, paraclínico y enzimático (niveles de actividad residual de enzima maltasa ácida en leucocitos entre 4.5-12.8% (controles normales 15.1-56.9%) que confirme el diagnóstico de enfermedad de Pompe.
- Pacientes que deseen participar voluntariamente en este estudio y que hayan firmado el consentimiento escrito informado, aprobado por el Comité de Ética de la Universidad del Rosario.

5.2.2 Criterios de exclusión

- Pacientes que deseen ser retirado del estudio de forma voluntaria.
- ADN insuficiente degradado y/o contaminado.

5.3 VARIABLES

Las variables incluidas en este estudio son de tipo cuantitativo-continuo y discreto, además de variables cualitativas nominales (Cuadro 11)

Cuadro 12. *Variables incluidas en el análisis de pacientes colombianos con Enfermedad de Pompe*

variable cuantitativa-continua	variable cuantitativa-discreta	Variables cualitativas nominales
% de inhibición de actividad enzimática	Número de pacientes incluidos en estudio	Género
Frecuencia de mutaciones	Edad de primeros síntomas	Cardiomiopatía hipertrófica
	Edad de diagnostico	Hepatomegalia
	CK (IU/L)	Bajo peso
	AST/ (IU/L)	Debilidad Muscular
	ALT (IU/L)	Dificultad Respiratoria
		Primer síntoma

5.4 TÉCNICAS DE RECOLECCIÓN DE LA INFORMACIÓN

Los datos de los pacientes analizados fueron registrados utilizando un formato de recolección de datos, en el cual se tabulan los datos correspondientes a la edad actual, edad de inicio de los síntomas, edad en la que se diagnosticó la enfermedad,

evolución de la misma a través del tiempo transcurrido, anexo de los exámenes paraclínicos y de laboratorio, valoración médica actual; y elaboración del árbol genealógico que proporciona información familiar y la presencia de más miembros afectados (si los hay).

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 PACIENTES

Trece pacientes con características clínicas consistentes con EP fueron incluidos en este análisis. Todos los pasos experimentales y clínicos fueron aprobados por el Comité de Ética e investigación de la Universidad del Rosario y cada paciente o representante legal proporcionó firmado el consentimiento informado (Anexo A). Se estudiaron nueve familias provenientes de diferentes ciudades de Colombia, diagnosticados con EP en los últimos 10 años.

El diagnóstico clínico fue en cada caso confirmado por la deficiencia de la actividad de alfa glucosidasa acida (GAA). La actividad fue medida en leucocitos de sangre periférica usando el sustrato fluorogenico 1-4-metil-lumbeliferil- α -D-glucosidasa en presencia de acarbosa. (Chamoles, 2004).

6.2 MEDICIÓN DE ACTIVIDAD DE ALFA GLUCOSIDASA ÁCIDA

La actividad de alfa-Glucosidasa ácida (GAA; EC3.2.1.3/20) fue valorada en aislamiento de leucocitos totales a partir de sangre Heparinizada, las muestras fueron obtenidas de 264 controles sanos colombianos (3 meses – 89 años) y 13 pacientes con enfermedad de Pompe. Los aislamientos leucocitarios se llevaron a sonicación en agua destilada. Se valoró la cuantificación proteica por el método comercial BCA (Bicinchoninic Acid (BCA) Protein Assay) y se usó un rango de 13-139 ug/ml para las estimaciones de actividad enzimática.

El método para la valoración de GAA involucra un protocolo modificado a partir del ensayo de Chamoles et al., usando 4 metillumbeliferil-alfa-D-glucopiranosido (4-MUG) como sustrato y acarbosa como un potente inhibidor para alfa-glucosidasas presentes en granulocitos que no están relacionadas con la enfermedad de Pompe

(Chamoles, 2004). El estudio permite obtener tres expresiones de actividad enzimática así: Actividad de Alfa Glucosidasa total a pH: 3,8, Actividad de Alfa Glucosidasa Inhibida a pH: 3,8 en presencia de Acarbosa 120 μ M y Alfa glucosidasa Neutra total a pH: 7.0. Se uso como Buffer Acetato de Sodio 0,4 M. La actividad final para cada Fracción se obtuvo en nM/mgProt/Hora.

Las valoraciones en forma independiente de las tres fracciones descritas anteriormente no permiten la discriminación de individuos afectados y población control, dado que se ha documentado la presencia de glucosidasas que pueden no ser afectadas por la presencia de acarbosa (Van Diggelen, 2009) o porque controles normales pueden mostrar ocasionalmente sobre-expresión de la fracción neutra que es frecuente en individuos afectados por Glucogenosis tipo II (Uribe, 2009). De ahí que se utilice el porcentaje de inhibición dado por la Acarbosa (Calculado a partir de la actividad total y la expresión de actividad inhibida) y el cociente obtenido a partir de la actividad de la alfa Glucosidasa total Neutra/ Alfa glucosidasa bajo inhibición de Acarbosa como los parámetros para discriminar los individuos afectados de la población control.

6.3 EXTRACCIÓN DE ADN

La extracción de ADN fue realizada a partir de leucocitos, (5ml de sangre periférica anticoagulada con EDTA utilizando el método deSalting out, (Miller, 1988). Este proceso involucra en primer lugar la lisis de eritrocitos, a través de medios físicos (baja temperatura) y químico (buffer de lisis:cloruro de amonio 155 mM; bicarbonato de sodio 10 mM, EDTA 1 mM, ácido bórico 500 mM), posteriormente se logra lisis de células blancas, degradación de proteínas por medio de un buffer que contiene Proteinasa K (Tris-HCl, pH 8.3, Tween 20, Nonidet P40, Proteinasa K), la cual destruye las membranas nucleares, liberando a la solución los ácidos nucleicos. El paso siguiente consiste en la precipitación de los ácidos nucleicos, ya que el DNA

presente en soluciones con alta concentración de sales acetato de sodio (AcONa) puede precipitarse mediante la adición de alcohol etílico a dichas soluciones.

6.4 DETECCIÓN DE MUTACIONES DEL GEN GAA

Delección del exón 18 (*del18*). Los primers usados para la detección de la delección del exón 18 (*del18*) fueron: forward 5' TGGTTCCTGAGGACACAGCATG y reverse 5' AGTGGCAGGTAGCCATCGGTG descritos previamente por Ausems et al, (Ausems, 1999). La mutación *del18* fue detectada al analizar el tamaño del fragmento sobre gel de agarosa al 1.2%, al observar dos fragmentos de diferentes tamaños, uno de 899 pb y uno de 363 pb indicando heterocigocidad para esa mutación, mientras que en estado homocigoto solo se observa una banda de 363 pb. La presencia de un fragmento de 899 pb fue indicativo de la presencia de un alelo *wild type*.

6.5 ANÁLISIS DE SECUENCIACIÓN PARA LA IDENTIFICACIÓN DE MUTACIONES EN LA REGIÓN CODIFICANTE Y EN EL INTRON 1 DEL GEN GAA

Los primers usados para la detección de la mutación c.-32-13 T>G en el intron 1 (IVS1) fueron: forward 5' TGCTGCAGTGCCAGCCGCGGTTGATGTCT y reverse 5' AGTGCAGCGGTTGCAAGGACACGGAGG descritos previamente por Ausems et al, (Ausems, 1999). La amplificación de intron 1 se corroboró al observar un fragmento de 210 pb en el gel de agarosa al 1.2%, el que, posteriormente se sometió a secuenciación y análisis. Se realizó la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) con primers específicos para lograr la amplificación de cada uno de los 19 exones codificantes (exones del 2 al 20) que componen el gen de GAA, (Ko, 1999) (Cuadro 13). Los productos amplificados fueron verificados en geles de agarosa al 1.2% teñidos con bromuro de Etidio para verificar que el peso molecular del producto amplificado.

Cuadro 13. *Secuencia de los primers de amplificación para la región codificante del gen GAA* (Tomados de Ko, 1999)

PRIMER	SECUENCIA (5' → 3')	Tamaño de fragmento (pb)
2F 2R	cgcggtgatgtctcagagctgc acccacacctgtgaggtgc	749
3F 3R	tgtccttggcgtgcgggtgttc ggtcgccctcccatcatgctg	264
4-5F 4-5R	ggtgctctctgggtgctctcagg catgcggacctccagtctccagg	489
6F 6R	cgcctgtgattggcccatctgtgg caggccaacgccgactcatgag	283
7-8F 7-8R	ttgtgggtagggcctgctccctg ccacacaggcacgaggatgacgc	518
9F 9R	Actgtctcagttttccgtgt Aaatcccacggtcttctgagg	275
1011F 1011R	ctcagtggggcttccatgcag gtgctaagtctcccaggccaga	442
12F 12R	agggagggcaccttgagcctg gcagaggcccaaccttgtagg	250
13F 13R	tgccctgctggtgacagggtcc ccggcaagcctcccatagaggcc	273
14F 14R	acttggcctgagctggctctgc ttcccaggggagagtcttgggt	276
15F 15R	tgagaagtgcagctctcccg gacagggctgcctgggagttacg	313
16F 16R	attcagccttctctgtgcctcc ttccgccacctggtcaccaac	335
17F 17R	gggagatggagagcgtggttcc ctccccaccatctccctgtgc	303
18F 18R	tgctgtaccagcctagcattccc agtggcaggtagccatcgtg	357
19F 19R	ccagctgtctgctgacacct caggacgcccagcaccttctgc	289
20F 20R	tctgagtcgctggggtctcactgc tggatacatctccctgcctg	721

6.6 CONDICIONES DE AMPLIFICACIÓN DE LA REGIÓN CODIFICANTE DEL GEN GAA

El ADN fue desnaturalizado a 94°C x 5 minutos. Las condiciones para los subsecuentes 34 ciclos fueron: 94°C x 45 segundos para la desnaturalización parcial, 61°C (exones 2, 3,4-5, 6, 7-8, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 20, IVS1) o 57°C (exones 9, 10-11, 18 y 19) por 45 segundos para el alineamiento, y 72°C por 45 segundos para la extensión. El último paso de extensión fue a 72°C por 10 minutos.

6.7 CONCENTRACIONES FINALES DE LOS REACTIVOS

Cuadro 14. *Concentraciones finales de los reactivos:* usados en la amplificación de los 19 exones codificantes, del 18 e IVS1

CONCENTRACIONES INICIALES	CONCENTRACIONES FINALES
Buffer 10X	1X
Primer Forward 10 pmol/μl	0,3 pmol/μl
Primer Revers 10 pmol/μl	0,3 pmol/μl
MgCl ₂ 25mM	1.5 mM
DNTP's 2mM	0.02 mM
Taq Polimerasa 1.2U	0,06U
ADN 200 ng	200 ng

Posteriormente a los productos amplificados se les realizó purificación siguiendo el protocolo descrito por el fabricante y utilizando el Kit PureLink® de invitrogen (kit K 3100-02).

6.8 SECUENCIACIÓN DE LOS EXONES DEL GEN GAA

Los primers de PCR a una concentración de 3.2 pmol/ul fueron usados para secuenciación en dirección sentido y antisentido (Ko, 1999) de la región codificante,

uniones exón-intron e intron 1 del gen *GAA*. Los análisis fueron realizados en un secuenciador automático ABI Prism 310.

6.8.1 Productos de PCR

- Se transfirieron los amplificados a tubos de 1.5 ml
- Se precipita con dos volúmenes de etanol absoluto y 1/10 de acetato de sodio 3M.
- Hacer vortex y colocar a 20°C por 3'-40 minutos
- Centrifugar a 12000 rpm por 10 minutos a 4°C. retirar el sobrenadante
- Secar el residuo a 60°C
- Proceder a realizar ciclos de secuencia

Para preparar la mezcla de reacción se usaron los siguientes reactivos usando Big Dye® terminator v3.1 cycle sequencing kit.

6.8.2 Mezcla para el ciclo de secuencia

Cuadro 15. *Mezcla para el ciclo de secuencia en ABI Prism310*: se describe los reactivos usados, la concentración inicial y el volumen usado para el ciclo de secuencia

Reactivo	Concentración inicial	Volumen
Premix de reacción	2.5X	4 µl
Big Dye sequencing buffer	5X	2 µl
Primer	3.2 pmol/ul	4 µl
Templado	25 ng	6 µl
Agua		4.0 µl
Volumen final		20 µl

Posteriormente se llevan estos productos a un termociclador y se programa con las condiciones descritas en el cuadro 16:

Cuadro 16. *Condiciones de la PCR de secuencia*

1.	Realizar una desnaturalización inicial: -Rampa rápida térmica a 96°C por un minuto
2.	Repetir lo siguiente durante 25 ciclos: -Rampatérmica *96°C -96 °C durante 10 segundos -Ramparápida térmica 50 ° C -50 ° C durante 5 segundos -Ramparápidatérmica 60 ° C -60 ° C durante 4 minutos *Ramparápida térmicaes de 1 °C / segundo
3.	Ramparápidatérmica 4° C y mantenerhasta que esté listopara purificar
4.	Girarhacia abajoel contenido delos tubosenunamicrocentrífuga
5.	Continuar con el proceso de purificación de los productos de extensión

Después del ciclo de secuencia se realizan los siguientes pasos:

- Resuspender el pellet entre 12-25 microlitros de formamida
- Hacer vortex y centrifugar (un PIN)
- Calentar las muestras a 95°C por dos minutos para desnaturalizar, al cabo de las cuales se colocan en hielo
- Hacer vortex y centrifugar las muestras nuevamente

Para cada reacción, cerca de 25 ng de ADN purificado con el Kit de purificación Pure Link de invitrogen (kit K 3100-02) fue usado como templado. Para la electroforesis en el ABI PRISM 310 se uso Pop 4. Posteriormente las muestras se colocaron en el secuenciador para ser procesadas bajo las siguientes condiciones:

- Tiempo de inyección: 30 seg
- Voltage de inyección: 1-2 Kv
- Temperatura de corrida: 50°C
- Voltaje corrido: 12.2 Kv (4-6 microamperios)
- Tiempo de corrido: 120 minutos

Las mutaciones fueron confirmadas por secuenciación de los productos de PCR por duplicado. Las muestras de ADN provenientes de los padres fueron usados para estudiar la segregación de las mutaciones.

6.9 ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS

Para el análisis de los archivos de los cromatogramas en formato ABI se usó la aplicación de FinchTV versión 1.4.0. (Las Secuencias de GAA fueron alineadas y comparadas con la versión wild type (EMBL/GenBank/DDBJ, numero de acceso Y00839.1 y NG_009822.1) y la secuencia referencia de las regiones codificantes NM_000152.3 usando el software Geneious versión 5.0.4 y el software ClustalW. La base de datos de mutaciones de la enfermedad de Pompe (Pompe disease Mutation database at <http://www.pompecenter.nl/>) fue usada para identificar las variantes en la secuencia de GAA reportadas previamente en la literatura.

6.10 NOMENCLATURA DE LAS MUTACIONES

NM_000152.3 fue usado como secuencia referencia para las regiones codificantes, por lo cual el nucleótido "A" del codón de inicio de traducción ATG en la posición del nucleótido 368 constituye la numeración +1 de la secuencia cADN. Este codón ATG representa +1 para la numeración del aminoácido como se establece por la secuencia de la pre-proteína alfa glucosidasa acida NP_000143.2. La localización de las mutaciones son asignadas al codon de inicio ATG en la posición 442, mediante el cual el nucleótido RefSeq constituye la numeración +1 de la secuencia cDNA.

Las mutaciones fueron descritas de acuerdo a la guía de nomenclatura de mutaciones según lo establecido por la human genome variation society (www.hgvs.org/mutnomen/). Las mutaciones intrónicas fueron asignadas por el número del intron (precedido por “IVS”) o por la posición de cDNA; los números positivos a partir de la G del sitio donador de splicing AG, los números negativos a partir a partir de la G del sitio aceptor del splicing AG, como fue descrito por den Dunnen, et al, (den Dunnen, 2000).

6.11 HERRAMIENTAS BIOINFORMÁTICAS

Para valorar el impacto de las dos nuevas mutaciones missense identificadas c.1106T>C (p.Leu369Pro) y c.2236T>C (p.Trp746Arg) se usaron los software SIFT, PolyPhen2, SNP & GO, MutPred y PANTHER.

La primera herramienta fue PolyPhen2 (*Polymorphism Phenotyping*), (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>) que predice el posible impacto de la substitución de un aminoácido sobre la estructura y función de la proteína humana, la predicción es basada sobre alineamientos múltiples, interacciones electrostáticas, propiedades físicas, consideraciones comparativas al igual que la estructura en 3D. El programa PolyPhen2 también predice sobre reglas empíricas aplicadas a la secuencia y usa información filogenética para comparar aproximadamente 80 secuencias homologas en las posiciones 369 y 746 perteneciente y estrechamente relacionada con la familia 31 de las glicosil hidrolasas (glycosyl hydrolase family 31 (GH31)).

La segunda herramienta bioinformática usada fue SIFT (<http://sift.jcvi.org/>), que predice si una sustitución de aminoácidos afecta la función de la proteína. La predicción de SIFT se basa en el grado de conservación de los residuos de aminoácidos en la secuencia de alineaciones derivados de secuencias estrechamente relacionadas, recogidos a través de PSI-BLAST.

SNP's&GO (<http://snps-and-go.biocomp.unibo.it/snps-and-go/info.htm>) menciona que la base genética de la variabilidad humana se debe a polimorfismos de nucleótido simple (SNP). Los SNP mas investigados son mutaciones missense que resultan en la sustitución del residuo de la proteína. SNP's&GO propone predecir las mutaciones relacionadas a la enfermedad a partir de la secuencia de la proteína, colectando un único marco de información derivado de la secuencia de la proteína, el perfil de la secuencia de la proteína y su función. Los resultados muestran efecto: neutral o enfermedad y el índice de confiabilidad (RI) con valores entre 0-10, resultados cercanos a 10 indican que la mutación está relacionada a la enfermedad.

MutPred (<http://mutpred.mutdb.org/>) es una herramienta desarrollada para clasificar la substitución de un aminoácido como asociado a enfermedad o neutral en humanos, adicionalmente predice la base molecular de la enfermedad. Se basa en SIFT y perdida/ganancia de 14 diferentes propiedades estructurales y funcionales. Por ejemplo la ganancia de propensión helicoidal o la pérdida de un sitio de fosforilación. Fue formada usando las mutaciones deletéreas de la base de datos de mutaciones del genoma humano y los polimorfismos neutrales de Swiss-Pro. La actualización consiste en la substitución del puntaje de SIFT por una versión más estable del código que calcula la conservación evolutiva. El conjunto de datos se ha actualizado para contener 39,218 mutaciones relacionadas a enfermedad de HGMD y 26,439 substituciones neutrales de Swiss-Pro. Mut Pred se interpreta de la siguiente manera: la salida de Mut Pred contiene una puntuación general (g), es decir la probabilidad de que la substitución de aminoácidos sea deletérea/asociada a enfermedad y cinco puntajes de propiedades (p), donde p es el valor-P para que ciertas propiedades estructurales y funcionales se vean afectadas.

Cierta combinación de altos valores del puntaje general (g) y bajos puntajes de las propiedades se conoce como hipótesis.

1. puntajes con $g > 0.5$ y $p < 0.05$ se refiere a una hipótesis factible
2. puntajes con $g > 0.75$ y $p < 0.05$ se refiere a una hipótesis fiable

3. puntajes con $g > 0.75$ y $p < 0.01$ se refiere a una hipótesis muy fiable

PANTHER(<http://www.pantherdb.org/about.jsp>) estima la verisimilitud de un cambio de aminoácido que causa un impacto funcional sobre la proteína prediciendo efectos deletereos. Este calcula el puntaje de subPSEC (substitution position-specific evolutionary conservation) basado sobre el alineamiento de proteínas relacionadas evolutivamente. UnsubPSEC menor de tres (-3) es el punto de corte para que la mutación sea descrita como patogénica, entre más bajo sea mayor probabilidad existe de que es más probable que sea dañina.

6.12 ANÁLISIS FUNCIONAL DE LAS VARIACIONES EN LA SECUENCIA DE GAA

El efecto funcional de las mutaciones nuevas encontradas en los pacientes colombianos analizados, fue realizado mediante la determinación de cambios en la actividad enzimática y patrones de Western Blot, utilizando construcciones plasmidicas generadas *In Vitro* y que contenían los cambios c.1106T>C (p.Leu369Pro) y c.2236T>C (p.Trp746Arg). Las mutaciones fueron introducidas en el vector de expresión pSHAG2 que contenía la secuencia *wild type* del cDNA del gen GAA. La generación de las mutaciones de interés se realizó mediante el proceso de Mutagenesis sitio dirigida, utilizando las condiciones descritas por Kroos et al y Hoogeveen-Westerveld et al. Mediante el Kit Stratagene y siguiendo las recomendaciones del fabricante, se logró la generación de la Mutagenesis sitio-dirigida de las variantes de interés, descritas anteriormente. (Kroos, 2008; Hoogeveen-Westerveld, 2011).

El protocolo de Mutagenesis dirigida fue también realizado para la generación de construcciones que portaron otras mutaciones que aunque habían sido reportadas previamente, no se tenía evidencia de su impacto funcional. Las mutaciones

generadas fueron: c.2236T>G (p.Trp746Gly), c.2237G>C (p.Trp746Ser), c.2238G>A (p.Trp746X) y c.2238G>C (p.Trp746Cys).

Cada una de las construcciones generadas para las seis mutaciones de interés, fueron secuenciadas, con el fin de verificar no solo la correcta introducción de la mutación deseada, sino para descartar la posibilidad de la generación de otras mutaciones secundarias a los procesos de PCR. Los constructos modificados fueron expresados de manera transitoria utilizando como modelo las células embriónicas de riñón humanas (HEK293). Las células HEK293 fueron transfectadas en paralelo con los constructos cDNA wild type y mutantes y recolectados 72 horas después. La actividad de la alpha glucosidasa acida fue medida tanto en el medio como en el homogeneizado de células. Se transfectaron células Mock como control negativo. Aparte de la medición de la actividad, el homogenizado de células y el inmunoprecipitado de alpha glucosidasa acida a partir del medio se aplicaron sobre SDS-PAGE seguido de western blotting para visualizar la biosíntesis y modificaciones post-traduccionales de la enzima.

6.13 DESCRIPCIÓN DE LA TÉCNICA MUTAGÉNESIS SITIO-DIRIGIDA

6.13.1 Diseño de los primers

Se utilizó la secuencia de referencia de cDNA de alpha glucosidasa acida a través de www.pompecenter.nl para diseñar los primers que permitirán la introducción de las mutaciones de interés. Se ubicaron las posiciones 1106 y 2236 donde se encontraron las dos nuevas mutaciones en los pacientes colombianos c.1106T>C (p.Leu369Pro) y c.2236T>C (p.Trp746Arg) (Figura 20). Para el diseño de cada uno de primers forward se escogieron entre 10 y 15 nucleótidos adyacentes en ambos sentidos a la posición 1106 (los nucleótidos se muestran de color amarillo en la Figura 19) y para el primer revers: el complemento de la secuencia que contiene el cambio por una C en sentido contrario (Cuadro 12), respecto la posición 2238 (la secuencia de

nucleótidos del primer se muestran de color amarillo en la Figura 20); para el primer revers, el complemento de la secuencia que contiene el cambio por una C en sentido contrario (Cuadro 13). La temperatura melting ideal de los primers tiene que ser mayor a 78, pero menor que 84 y se halla con el desarrollo de la siguiente formula:

$$Tm = 81,5 + (0.41 * \%GC) - (675 / \text{numero de nucleótidos}) - 3.$$

Reference sequence acid α -glucosidase cDNA

identical to Y00839 but A of start codon ATG is counted as number 1
posición

```

982 CTTAGCTGGA GGTGACAGG TGGGATCCTG GATGTCTACA TCTTCCTGGG CCCAGAGCCC
1042 AAGAGCGTGG TGCAGCAGTA CCTGGACGTT GTGGGATACC CGTTCATGCC GCCATACTGG
6GG7
1102 GGCC TGGGCTTCCACCTG TG CCGCTGGGGC TACTCCTCCA CCGCTATCAC CCGCCAGGTG
1162 GTGGAGAACA TGACCAGGGC CCACTTCCCC CTGGACGTCC AATGGAACGA CCTGGACTAC
7GG8
1222 ATGGAATCCC GGAGGGACTT CACGTTCAAC AAGGATGGCT TCCGGGACTT CCCGGCCATG
1282 GTGCAGGAGC TGCACCAGGG CGGCCGGCGC TACATGATGA TCGTGGATCC TGCCATCAGC
8GG9
1342 AGCTCGGGCC CTGCCGGGAG CTACAGGCCC TACGACGAGG GTCTGCGGAG GGGGGTTTTTC
1402 ATCACCAACG AGACCGGCCA GCCGCTGATT GGAAGGTAT GGCCCGGGTC CACTGCCTTC

```

Figura 19. *Diseño de Primers para p.Leu369Pro*. Muestra la secuencia referencia de cDNA-GAAd a través de www.pompecenter.nl/ usada para el diseño de los primers que contienen la mutación. En la posición 1106 se muestra la T en rojo que es cambiada por C, y los nucleótidos adyacentes que podrían componer la secuencia del primer se muestran en amarillo

Reference sequence acid α -glucosidase cDNA

identical to Y00839 but A of start codon ATG is counted as number 1 position

```

1942 GGCTTCCTGG GCAACACCTC AGAGGAGCTG TGTGTGCGCT GGACCCAGCT GGGGGCCTTC
2002 TACCCCTTCA TGC GGAACCA CAACAGCCTG CTCAGTCTGC CCCAGGAGCC GTACAGCTTC
14GC15
2062 AGCGAGCCGG CCCAGCAGGC CATGAGGAAG GCCCTCACCC TGC GCTACGC ACTCCTCCCC
2122 CACCTCTACA CACTGTTCCA CCAGGCCAC GTCGCGGGGG AGACCGTGGC CCGGCCCTTC
2182 TTCCTGGAGT TCCCAAGGA CTCTAGCACC TGGACTGTGG ACCACCAGCT CCTG GGGGG
15AG16
2242 GAGGCCCTGC TCATCACCCC AGTGCTCCAG GCCGGAAGG CCGAAGTGAC TGGCTACTTC
2302 CCCTTGGGCA CATGGTACGA CCTGCAGACG GTGCCAATAG AGGCCCTTGG CAGCCTCCCA
16GG17
2362 CCCCCACCTG CAGCTCCCCG TGAGCCAGCC ATCCACAGCG AGGGGCAGTG GGTGACGCTG

```

Figura 20. *Diseño de primers para p.Trp746Arg*. La secuencia referencia de cDNA-GAA a través de www.pompecenter.nl/ es usada para el diseño de los primers que contienen la mutación. En la posición 2236 se muestra la T en rojo que es cambiada por C, y los nucleótidos adyacentes que componen la secuencia del primer se muestran en amarillo.

Adicionalmente se diseñaron los otros cuatro pares de primers para introducir otras mutaciones previamente reportadas, que conduce a un cambio de p.Trp746. En la posición c.2236T>G (p.Trp746Gly), (cambio de una T por G en la posición 2236, la T se muestra de color rojo en la Figura 21), c.2237G>C (p.Trp746Ser) (cambio de una G por C en la posición 2236, la G se muestra de color verde en la Figura 21), y finalmente el cambio de una G por una A y una C en la posición 2238 que conllevan a los cambios c.2238G>A (p. p.Trp746X) y c.2238G>C (p.Trp746Cys) respectivamente (la G en la posición 2238 se muestra de color violeta en la Figura 21). Para el diseño de cada uno de primers forward se escogieron entre 10 a 15 nucleótidos adyacentes en ambos sentidos a la posición 2236, 2237 y 2238 (los nucleótidos se muestran en la Figura 21 de color amarillo) y para el primer revers, el complemento de la secuencia que contiene el cambio deseado (Cuadro 17). La

temperatura melting de los primers se hallaron con la fórmula que se describió previamente.

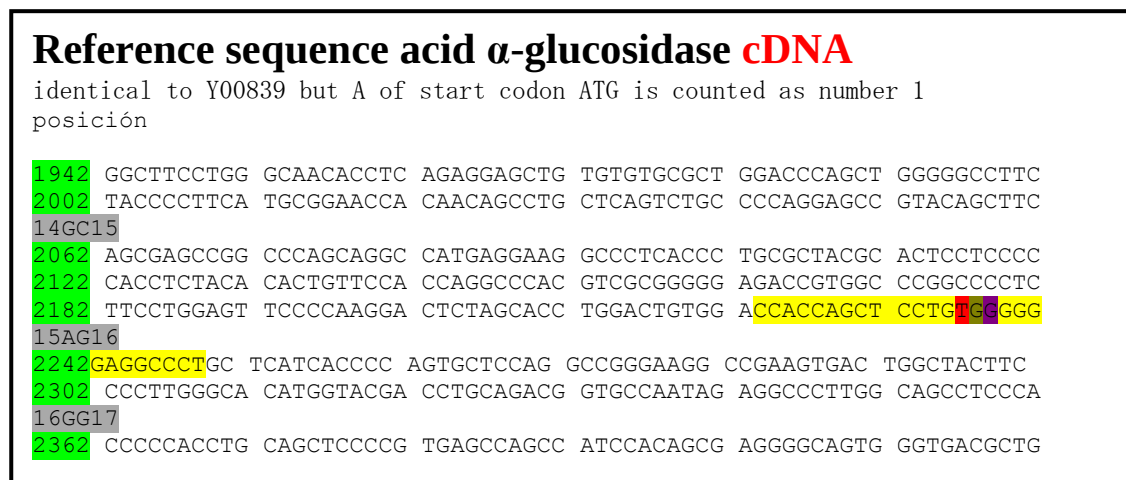


Figura 21. Diseño de primers para otras mutaciones que conducen a cambio de p.Trp746. Secuencia referencia de cDNA-GAA a través de www.pompecenter.nl/ es usada para el diseño de los primers que contienen las cuatro mutaciones previamente reportadas. En la posición 2236 se muestra la T en rojo que es cambiada por G, en la posición 2237 la G que es cambiada por C se muestra en verde y 2238 que es cambiada por A y C en violeta. Los nucleótidos adyacentes que componen la secuencia del primer se muestran en amarillo

Cuadro 17. Primers usados en mutagenesis sitio-dirigida. El nucleótido que es cambiado para introducir la mutacion deseada se muestra en rojo.

Cambio de nucleótido	Cambio de aminoácido	Primer Forward	Primer Revers
c.1106T>C	p.Leu369Pro	ccatactggggcccgggcctccacctg	caggtggaagcccgggccccagtatgg
c.2236T>C	p.Trp746Arg	ccagctcctgcggggggaggccctg	cagggcctcccccgaggagctgg
c.2236T>G	p.Trp746Gly	ccagctcctgcggggggaggccctg	cagggcctcccccgaggagctgg
c.2237G>C	p.Trp746Ser	ccagctcctgcggggggaggccctg	cagggcctccccgacaggagctgg
c.2238G>A	p.Trp746X	ccagctcctgtgaggggaggccctg	cagggcctccccacaggagctgg
c.2238G>C	p.Trp746Cys	ccagctcctgtcgagggaggccctg	cagggcctccccgacaggagctgg

6.13.2 Mutagenesis sitio-dirigida

El constructo de expresión wild type (pSHAG2) fue fabricado por Hoefsloot L, Hoogeveen M, Oostra B, Reuser AJ and Kroos MA en los años 90's, y los constructos cDNA de GAA mutantes fueron derivados a partir del constructo de expresión wild type usando el kit de Mutagenesis sitio-dirigida Stratagene. En cada caso el marco de lectura abierto de los constructos mutantes fueron verificados por análisis de la secuencias. El DNA fue preparado usando el *Plasmid Plus Midi Purification Kit* (Qiagen, Venlo, The Netherlands). En la mayoría de los casos, múltiples clones fueron aislados, verificados, y usados para los ensayos descritos anteriormente. Las células HEK 293T fueron sembradas dentro de platos de 24 pozos y crecieron toda la noche en medio de Eagle modificado por Dulbecco (Lonza, Verviers, Belgium) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS), 50 U/ml de penicilina y 50 µg/ml de estreptomycin, en un incubador humificado de dióxido de carbono al 10%. Las células confluyentes en un 50% fueron transfectadas con 1750 µg de ADN en 250 µl de DMEM (-/-) con la expresión de cada uno de los constructos usando 6.75 µl de polímero polietilenimina (PEI) en 200 µl de DMEM (-/-). Las células que expresan las variantes fueron comparadas con el wild type y las variantes patogénicas.

Después de 3-4 horas la mezcla de la transfección con PEI fue desplazada con DMEM (+/+) suplementada con 10 % de FBS, 50 U/ml de penicilina y 50 µg/ml de estreptomycin. 72 horas después de la transfección las células fueron transferidas sobre hielo, lavadas con buffer salino de fosfato (PBS) a (4° c), y recolectadas en 75 µl de buffer de lisis (50 mM Tris-HC pH 7.0, 150 mM NaCl, 50 mM de NaF y 1% de Triton X-100) (complete, Roche Molecular Biochemicals, WOERBEN, The Netherlands). Después de centrifugación (10.000 x g por 10 minutos a 4° c), las fracciones de los sobrenadante fueron recuperadas y mezcladas con buffer de carga e incubadas a 96° c por 5 minutos previos a la electroforesis sobre gel de gradientes

SDS-PAGE. Posteriormente las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa.

Los Blots fueron bloqueados por una hora a temperatura ambiente con 5 % de leche en polvo en PBS, e incubados toda la noche a 4° c con anticuerpos policlonales primarios (anticuerpos de conejo y ratón). Los anticuerpos fueron diluidos en PBS que contenían 0.1 % de Tween 20 (PBST). Después se realizó un lavado por 3 veces, durante 5 minutos en PBST, los blots fueron incubados por 1 hora a temperatura ambiente bajo oscuridad en PBST, que contenía anticuerpos secundarios: goat anti-mouse IRDye 800LT (LI-COR Biosciences) goat anti-rabbit IRDye 700LT (LI-COR Biosciences). Después de lavar 3 veces en PBST y una vez en PBS los blots fueron escaneados usando Odyssey™ infrared imager (Li-Cor Biosciences).

6.13.3 Descripción de la técnica Mutagenesis sitio-dirigida

La lista de reactivos utilizados se lista en el Anexo B.

PCR para la Reacción de Mutagenesis

- 16,5 µl H₂O
- 2,5 µl buffer 10X
- 1.5 µl agua MilliQ
- 1 µl pSHAG2
- 1, 25µl primer Forward 100 ng/µl
- 1, 25µl primer Revers 100 ng/µl
- 0.5 µl de dNTP's
- 0.5 µl de ADN polimerasa Pfu Turbo
- Programa de Termociclador:

Paso 1: 60''95°

Paso 2: 50" a 95 °, 50" 60°, 8' 68° 18x

Paso 3: 7' 68°C

Paso 4: 4°, detener

Corte del templado

-Adicionar 1 µl de DnpI

-Tomar el control de PSHAG2 con 18 µl (180ng) + 2µl de buffer + 1 µl de DnpI, dejar 1 hora a 37°C

Placas de cultivo

-Tomar una botella con 500 ml de agua

-Adicionar 7,5 g de agar y autoclavar

-Agregar AMP 10X

-Después de enfriar se vierte en placas

-Mantener a 4°C hasta uso

Transformación

-Calentar el baño maría a 42°C, el caldo NZY + se calienta a 42°C y se enfria en tubos falcon de 14 ml a 4°C

-Descongelar las células ultracompetentes mantenerlas en hielo (no hay más de 100 µl por tubo)

-Añadir 2µl betaMEP (beta-mercaptoetanol) y mezclar con 45 µl de células (con la punta de la pipeta mezclar suavemente)

-Deje reposar por 10 minutos en hielo y revolver cada 2 minutos

-Pipete 2 µl de ADN digerido

-Tome 1 µl de control

- Dejar reposar 30 minutos sobre hielo
- 30 segundos en baño maria a 42°C
- 2 minutos en hielo
- Añadir 0.5 ml de caldo NZY+ y 1 hora a 37°C agitando a 225-250 r.p.m.
- Mientras tanto las placas permanen en el horno a 37°C
- El constructo PSHAG: 100 µl y 450 µl de la transformación incubar toda la noche a 37° c

Ajuste de MINI's o MIDI's

- Verifique las placas y el recuento de colonias por placa mayor al 80%
 - Las placas pueden permanecer pocos días en refrigerador
 - Tome de una placa si es posible 6 MINI's
- Si hay muchas colonias en las placas entonces es igual a 2 MIDI'S
- Ponga a crecer en 2 ml de medio durante toda la noche a 37°C y a agitando a 250 r.p.m

Procesamiento de MINI's

- Colocar 1.5 ml del cultivo en un tubo eppendor, centrifugar a 4300 r.p.m por 5 min resuspender el pelet en 100 µl de maxiprep (S1) sobre hielo.
- Tomar 200 µl SDS (S2) y adicionarlos, agitar vigorosamente y dejarlos 3 minutos sobre hielo
- Añadir 150 µl de CLK 3M (S3) frio agitar vigorosamente y llevar a centrifugar a 4300 r.p.m. por diez minutos
- 350 µl de lo anterior en un nuevo tubo y pipetee un volumen 1:10 de (35 µl) de NaAc 3 M pH 4,8 y dar vortex
- Adicionar 1 ml de isopropanol y mezclar
- Llevar a centrifugar 15 minutos
- Lavar el precipitado con 1 ml de etanol al 70% por dos minutos y volver a realizar

- Dejar secar el pellet por 15 minutos
- Disolver en 50 µl de agua o TE y almacenar a 4°C

Procesamiento de MIDI'S

Usar el kit y los requerimientos de Qiagen

- Resuspender el pellet bacteriano en 4 ml de buffer P1
- Adicionar 4 ml de buffer de P2, mezclar generosamente por inversión, e incubar a temperatura ambiente por 3 minutos.
- Adicionar 4 ml de buffer S3 al lisado y mezclar inmediatamente por inversión de 4-6 veces. No incubar el lisado sobre hielo
- Transferir el lisado al filtro QIA e incubar a T° ambiente por 10 minutos
- Durante la incubación prepare el colector de vacío y las columnas Qiagen
- Insertar suavemente el embolo en el cartucho de filtro QIA y filtre el lisado de células Dentro de un nuevo tubo, permitiendo espacio para la adición de buffer BB
- Adicione 2 ml de buffer BB al lisado y mezcle por inversión de 4-6 veces
- Transferir el lisado a las columnas QIAGEN con un tubo extensor adherido al filtro QIA
- Cambie el colector de vacío y pase la solución a través de la columna QIAGEN plasmid Plus Midi
- Después de que el líquido haya sido aspirado por toda la columna, cambiar el colector de vacío
- Para lavar el ADN adicione 0.7 ml de buffer ETR y proceda con uno de los dos siguientes pasos:
 1. Lavar usando el colector de vacío:
 - Después de adicionar 0,7 ml de Buffer ETR, cambiar el colector de vacío. Después de que el líquido haya atravesado la columna, cambiar nuevamente el colector de vacío.
 2. Lavar usando la microcentrifuga:

- Descartar los tubos de extensión y situar las columnas QIAGEN dentro de los tubos de colección de 2 ml proporcionados.
- Lave la columna y adicione 0,7 ml de ETR, centrifugar por 1 min a 10.000 g., descartar el flujo
- Para completar, remueva el buffer de lavado residual, centrifugar la columna por 1 minuto a 10.000 g en una micro centrífuga
- Situvar la columna QIAGEN dentro de un tubo limpio de microcentrifuga de 1.5 ml. Para eluir el ADN, adicione 200 µl de buffer EB (10 mM TRIS-Cl, pH8.5 o agua por el centro de la columna o buffers como ET.

Tratamiento con RNasa y precipitación con alcohol (no MIDIS's)

- Adicionar 50 µl 10 mM de TRIS pH 7.5 y 0.2 µl de RNAasa A 10 mg/ml dejar en reposo durante 1 hora
- Añadir 100 µl de TRIS y 200 µl de fenol agite bien
- Centrifugar 5 minutos
- 200 µl de lo anterior en fase acuosa a un tubo eppendor limpio
- Añadir 20 µl 3M de NaAc y 600 µl de etanol 70%
- Mezclar bien por 1 hora a -80°C
- Centrifugar 10 minutos, colocar los tubos en la misma ubicación
- Agregar 300 µl de etanol al 70% dejar por 5 minutos y realizar esta misma operación nuevamente
- Dejar al aire por 15 minutos para secado
- Agregar a los pellets 50 µl de H2O o TE
- Verificar 1 µl en un gel de agarosa al 0.7%

Prueba de digestión de MINI's y determinación de concentración

- Tomar 3 µl de ADN (MINI's)

- 2 µl de buffer Reac 3
- 15 µl de H₂O
- 0,17 µl de ECORI (50U/µl) (se realiza la digestión para verificar la longitud del inserto)
- Incubar 3 horas a 37°C
- Como control 250 ng de pSHAG2
- Verificar en gel de agarosa al 1%
- Estimar la cantidad y diluir a una concentración de 250 ng/µl
- Se realiza secuenciación de cada uno de los productos para verificar que se haya insertado la variación de la secuencia que se desea analizar. En los cromatogramas se evidencia la correcta introducción de las mutaciones para Leu369Pro, para pTrp746X y Trp746Gly (Ver figuras 22, 23 y 24)

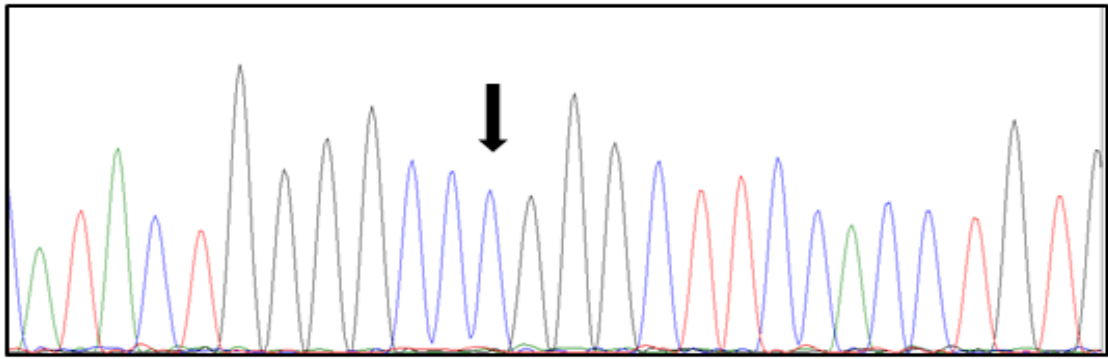


Figura 22. *Cromatograma que muestra éxito de la Mutagenesis sitio dirigida.* Véase en el cromatograma el cambio de una T por una C mostrando homocigocidad en esta posición para C, concluyendo que la variación en la secuencia c.1106T>C (Leu369Pro) se realizó con éxito

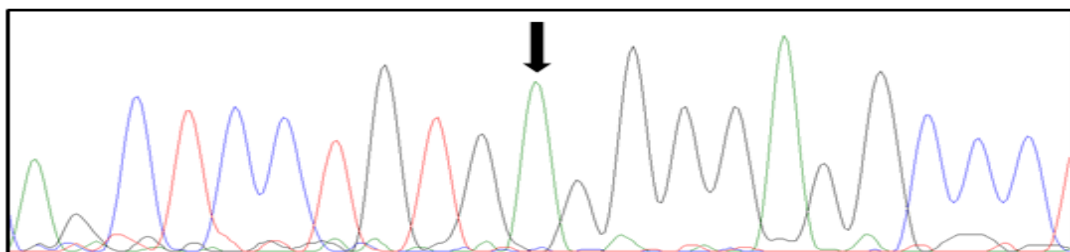


Figura 23. *Cromatograma que evidencia el éxito de la Mutagenesis sitio dirigida.* Véase en el cromatograma el cambio de una G por una A en la posición 2238, mostrando homocigocidad para A en esta posición, concluyendo que el cambio de una G>A en esta posición se realizó con éxito.

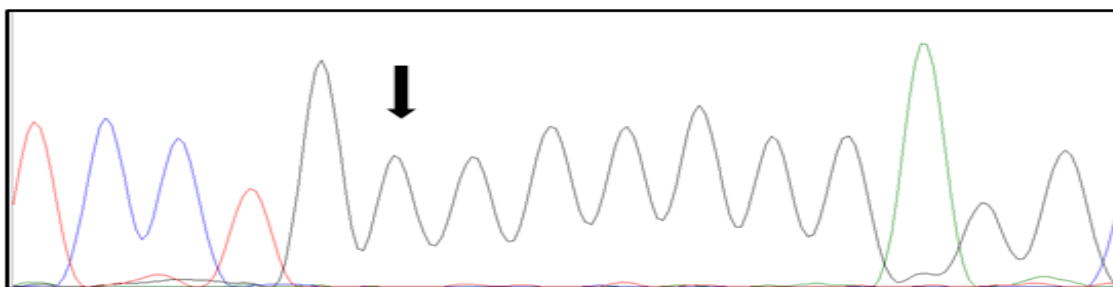


Figura 24. *Cromatograma que evidencia el éxito de la Mutagenesis sitio dirigida.* El cromatograma muestra el cambio de una T por una G en la posición 2236 en estado homocigoto, comprobando que el cambio se realizo con éxito.

La secuenciación y la comprobación de la mutación se realizo así sucesivamente para cada uno de los constructos

Reacción de PCR

A continuación se describen los reactivos y la cantidad de cada uno de ellos, requeridos para la PCR, después de haber realizado mutagenesis sitio-dirigida, y haber verificado la correcta introducción de cada uno de los cambios deseados.

Cuadro 18. *Reactivos y cantidades usadas en PCR después de transformación*

Reactivo	Cantidad (μl)		
H ₂ O	18,75		
10xPCR	2,50		
d-NTP's10mM	0,50		
Taq-pol	0,25		
primer F (5 pmol)	1,00	primer F (20 pmol)	0,25
primer R (5 pmol)	1,00	primerR(20 pmol)	0,25
DNA 0,01 μg/μl	1,00		
Total	25,00		

Programa:

59°C durante 30 ciclos

94° c x 2'

94°C x 30", 59°C x 1', 72c x 1.5'30X

72°C x 10'

4°C hasta detener

Duración del programa: 3,5 horas

Cuadro 19. *Primers usados para la amplificación del gen GAA después de la transformación.* Se detalla los exones amplificados con su tamaño en pb, el nombre, la concentración de los primers F y R y sus respectivas diluciones

		PRIMER Forward				PRIMER Revers			
exon	tamaño	Nombre	concentración	dilucion a 20 pmo/ µl		Nombre	concentración	dilucion 20pmol/µl	
	pb		pmol/µl	primer	agua		pmol/µl	primer	Agua
2-2	313	M13-cGAA2AF	100	20	80	M13-cGAA2AR	100	20	80
2-6	387	M13-cGAA2BF	100	20	80	M13-cGAA6R	100	20	80
5-9	225	M13-cGAA5F	100	20	80	M13-cGAA9R	100	20	80
9-15	471	M13-cGAA9F	100	20	80	M13-cGAA15R	100	20	80
12-17	218	M13-cGAA12F	100	20	80	M13-cGAA17R	100	20	80
16-20	396	M13-cGAA16F	100	20	80	M13-cGAA20R	100	20	80

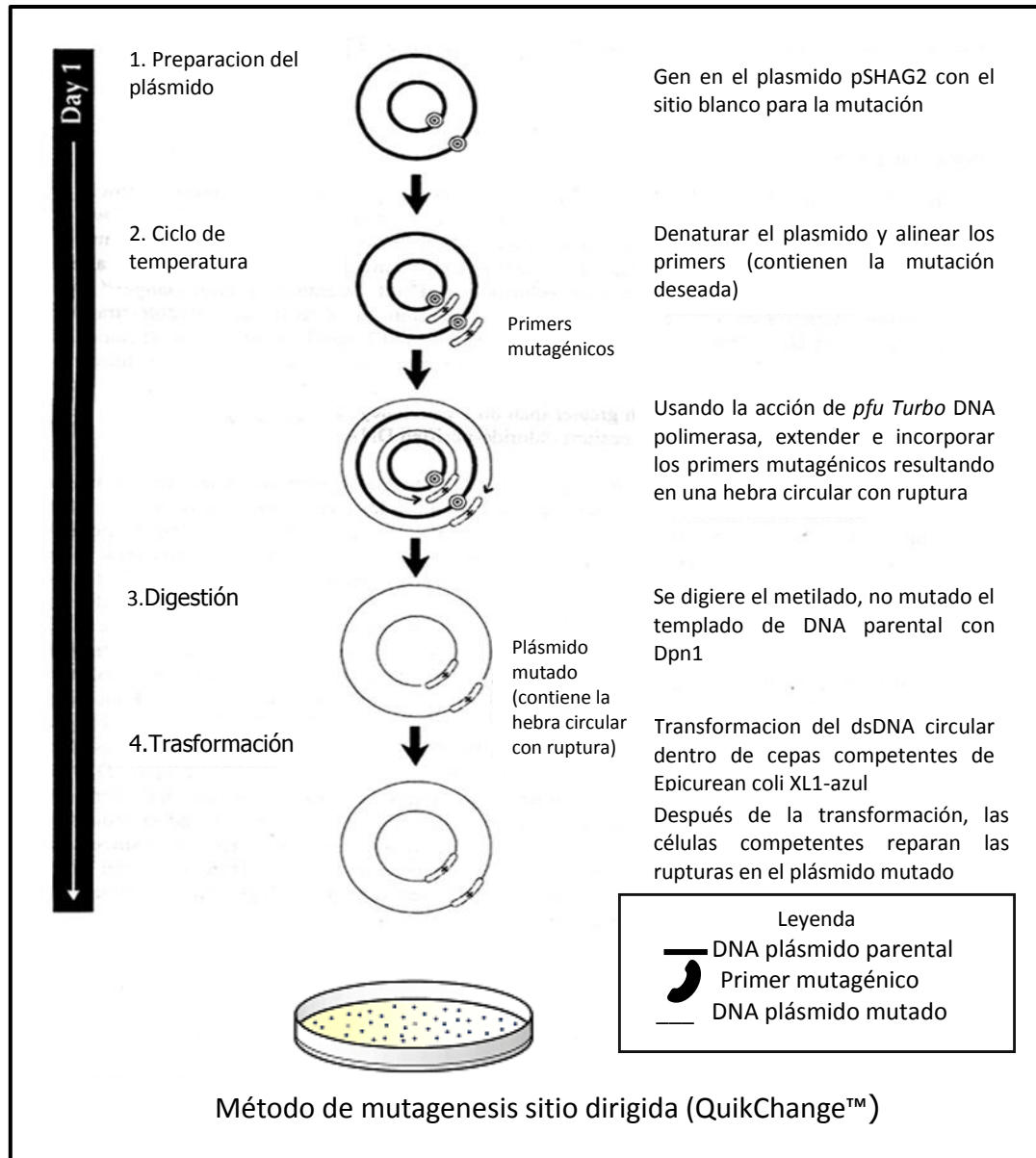


Figura 25. Método de mutagenesis sitio dirigida

Trasfección. La descripción de la técnica se presenta en la figura 26

1. Usar placas de 25 cm² con las células HEK293 (4×10^5) un día antes de la tranfeccion
2. Diluir 1740 µg de ADN en 250 µl de medio sin suero µl DMEM -/- vortex, e incubar 15' a temperatura ambiente
3. Diluir 6,75 de PEI dentro de 200 µl del medio DMEM -/-

4. Combinar PEI + ADN, mezclar e incubar 15' a temperatura ambiente
5. Al ver +/- 50% de confluencia remplazar el medio por medio fresco
6. Adicionar el complejo a las células incubar 3 horas y colocar en CO₂ al 10%
7. Adicionar DMEM con suero y antibiótico +/- e incubar por setenta y dos horas para recolección

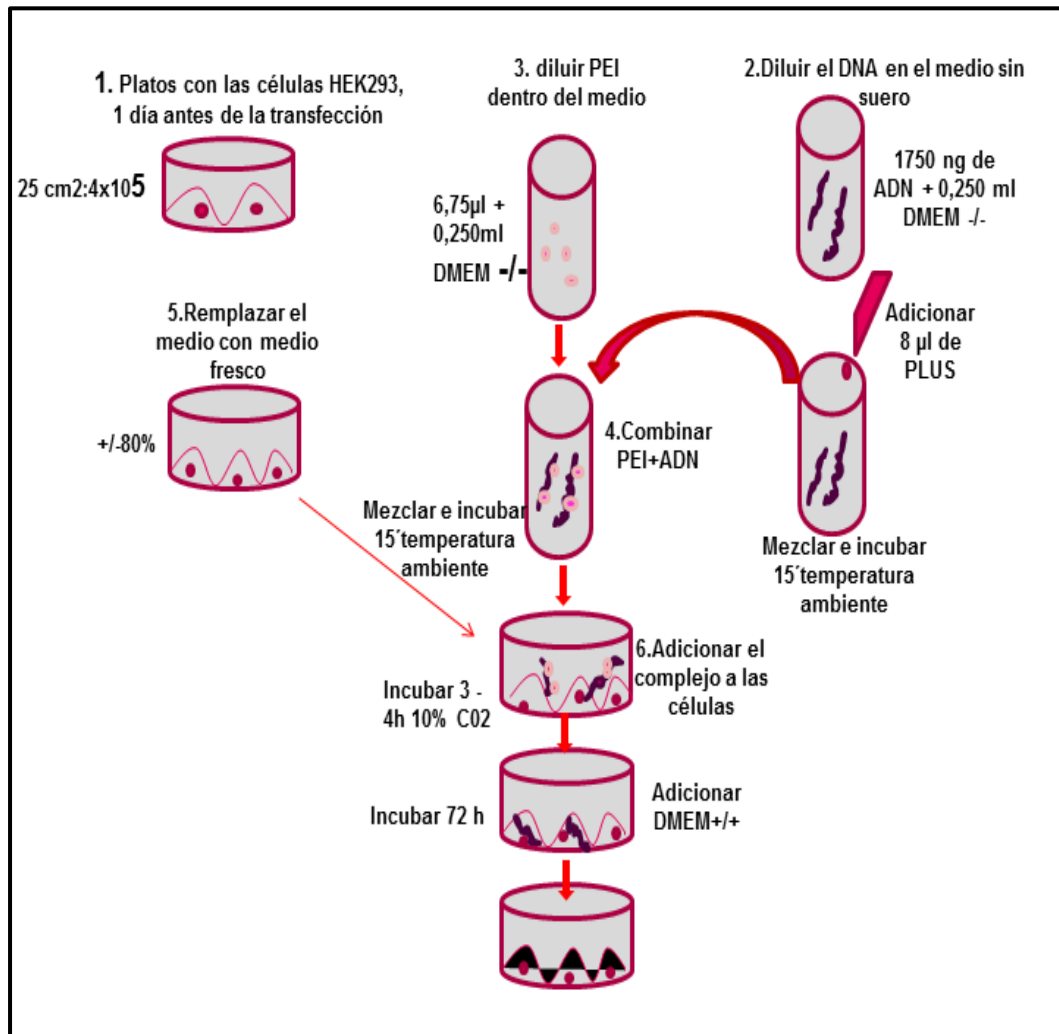


Figura 26. Descripción de la transfección en células HEK293

Recolección del medio y células, determinación en 4MU y BCA, PAGE y blotting.

Los reactivos utilizados en las siguientes técnicas se listan en el Anexo C.

Método de trabajo en células HEK293 transfectadas

Procedimiento:

Resumen

Recolectar las células HEK293 transfectadas después de 72 horas (3 días) y medir directamente la actividad de alfa glucosidasa acida en el medio.

En detalle

Preparación

- Pipetear 20 µl 0,2 M NaAc pH 4,1 en una serie de tubos
- Obtener un tubo eppendorf de 5 ml que contenga el sustrato 4MU del congelador de -20°C
- Llevarlo al microondas por 30 segundos hasta que el sustrato se vea transparente (sin dejar hervir)
- Pipetear para cada muestra por duplicado 20 µl del sustrato 4MU en una placa de 96 pocillos, mas dos blancos

Medio

- ***Recolección y determinación del medio con 4MU de acuerdo al protocolo***

- Pipetear el medio de transfeccion del plato sobre el primer set de tubos eppendorf con 20 µl 0.2 M NaAc pH 4.1
- Centrifugar 5 minutos a 4300 r.p.m.
- Pipetear 950 µl en una segunda serie de tubos eppendorf. Colocarlos sobre hielo. Note que el color no es purpura.
- Pipetear 10 µl por duplicado en la placa de prueba para el sustrato
- Dar un giro suave a la placa de 96 pozos para asegurarse de que se mezcle bien el sustrato y el medio

-Incubar a 37°C por 30 min, detener la reacción agregando 200 µl de stop buffer, medir en espectofotometro a 335/448 de absorbancia (los resultados se muestran en la Cuadro 31)

- ***Precipitación del medio para procedimiento del medio del blot***

-Si la medición es buena precipitar el medio para el procedimiento del blot

-Añadir 3 µl de anticuerpo de conejo anti-alfa-glucosidasa acida (1691) y llevar a incubar (en rotación) a 4°C

-Calcular la cantidad de bolas PROT A1:2, 45µl por muestra alrededor de la cantidad requeida sobre la parte superior

-Vortex y agregue la cantidad necesaria en un nuevo tubo

-Lavar 2X las bolas PROT A con H₂O o DEMI

-Tomar las bolas PROT A en un volumen separado

-Adicionar 45 µl de bolas PROT A lavadas al medio con antisuero hacer esto con una punta de corte y pipeta de 200 µl

-Dejar toda la noche a 4°C

-Después de dos lavados precipitar con 1 ml de PBS después de la última vez pipetear el PBS lo más posible y descartarlo

-Inmediamente adicionar 30 µl 1X de SB y dejar 10 minutos a 90°C si no hay tiempo para correr el gel y el blotting, mantener las muestras a -20°C.

Células

-Lavar las células suavemente con 1 ml de PBS a través de la pared, remover el medio la placa, colocarla oblicuamente y pipetear el liquido de la placa varias veces

-Lisar las células con 100 µl de buffer de lisis en la parte inferior de la placa para removerlas y rayar la placa en esta área por 10 minutos.

-Pipetear todo el lisado de las células en un tubo eppendor y centrifugar por 10 minutos a 10.000 g. en la centrifuga del cuarto frio.

- Pipetear en un tubo nuevo
- Almacenar a -20°C

- ***Determinación en células de acuerdo al protocolo 4MU***

- Pipetear 10 µl del lisado de células por duplicado en la placa que contiene 20 µl de sustrato 4MU.
- Dar un giro a la placa de 96 pozos para asegurarse de que el lisado de células se mezcle bien con el sustrato
- Incubar 30 minutos a 37°C y parar la reacción con 200 µl de buffer de lisis medir en espectofotometro a 335/448

- ***Determinación en células de acuerdo al protocolo BCA***

- Diluir el lisado de células 5 veces con agua
 - Pipetear 10 µl del lisado de células por duplicado en una placa de 96 pozos transparente
 - Pipetear 200 µl de reactivo BCA
 - Incubar por 30 minutos a 37°C y medir la absorbancia en el espectofotometro de acuerdo al protocolo
- Los cálculos se muestran en la Cuadro 26 con los resultados del porcentaje en células de cada uno de los constructos, mock (control negativo y control positivo (pSHGA))

6.13 ELECTROFORESIS EN SDS-PAGE

- 15µl del lisado con 15 µl de buffer para las muestras lisadas, calentarlas por 10 minutos a 90°C y cargarlas en el gel
- Gel visible de 0.5 nmol
- Correr cerca de 2 horas (en frio) con buffer MOPS para geles de gradiente de 4-12% a 125-150 V

- Blotting cerca de media hora en buffer Tris-MeOH a 100 V
- Colocar el gel en leche en polvo con PBS cerca de 1 hora
- Incubar el blot toda la noche con 4 μ l de anticuerpo anti-alfa glucosidasa de conejo o pool de anti-alfa glucosidasa de raton in PBS (tiene 50% de señal comparada con anti-alfa glucosidsa)
- Lavar el blot 7 veces con PBST
- Usar el correspondiente segundo anticuerpo a una dilución 1 en 5000 veces de PBST e incubar por una hora a temperatura ambiente bajo oscuridad
- Lavar el blot dos veces en PBST y una vez en PBS en un contenedor cerrado y llevar al scanner oddysay para ver el blot.

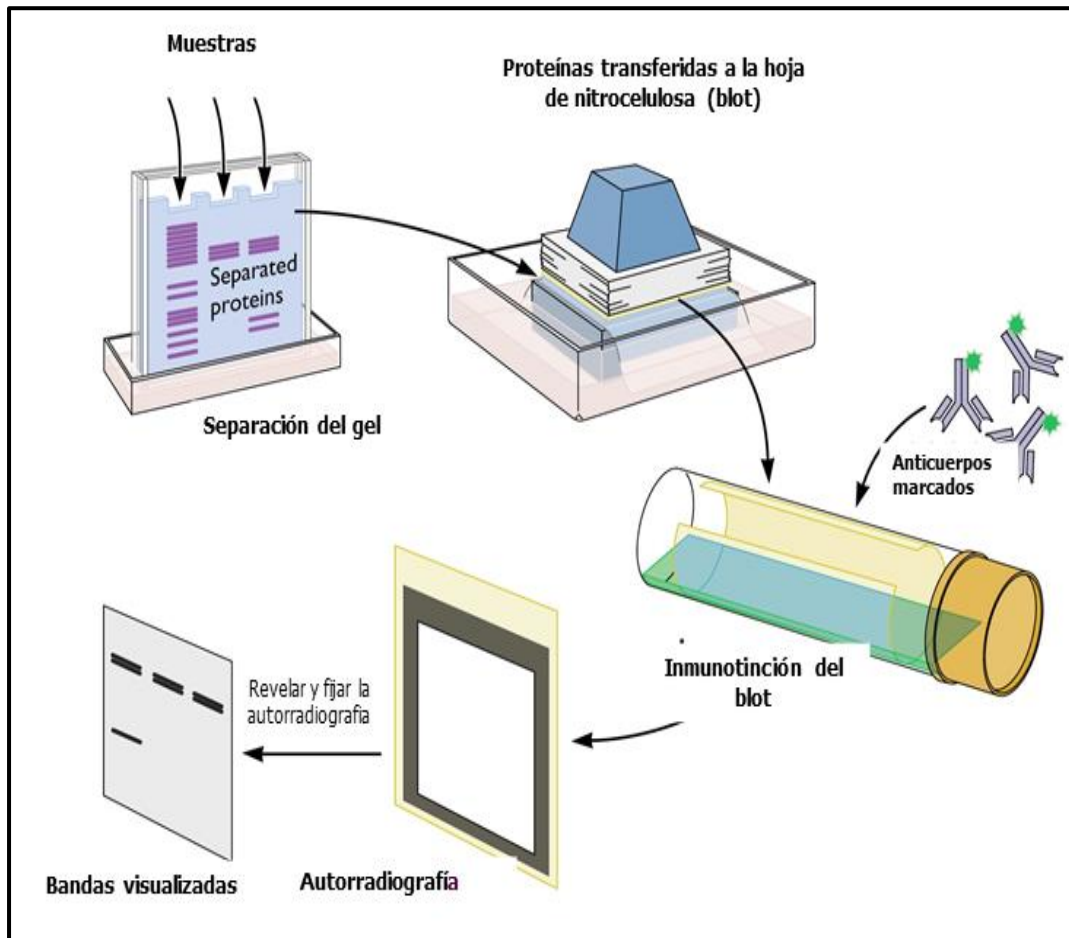


Figura 27. Descripción de la técnica western blot

7. ASPECTOS ESTADÍSTICOS

La estimación de las frecuencias alelicas para cada una de las mutaciones encontradas, fueron directamente calculadas por medio de conteo directo a partir del número observado de cada mutación y el número total de alelos analizados. De la misma manera fueron determinados los porcentajes para cada una de las variables clínicas en la totalidad de pacientes incluidos en el estudio.

8. ASPECTOS ÉTICOS

Los procedimientos usados se efectuaron de conformidad con las normas éticas establecidas por el comité responsable de experimentación humana de la Universidad del Rosario y con la declaración de Helsinki (Anexo A).

9. RESULTADOS

9.1 VARIABLES DEMOGRÁFICAS Y MEDICIÓN DE ACTIVIDAD DE ALFA GLUCOSIDASA ÁCIDA

Los estudios en población control (n=264) mostraron una relación Fracción Neutra/Inhibida Inferior a 15 (percentil 95 % = 10,74) y el porcentaje de inhibición fue menor al 85 % (percentil 95 % = 83,9). Comparativamente los estudios en individuos afectados por enfermedad de Pompe (n=13) ofrecieron un cociente de 17 a 68,4 y un porcentaje de inhibición de 87,2 a 95,9.

Se analizaron 13 casos en nueve familias Colombianas con diagnóstico confirmado de EP. Los pacientes PD04, PD05 y PD06 son hermanos, así como los codificados PD09, PD10 y PD12, PD13. El 38,5% (5) eran mujeres y el 61,5% (8) pertenecen al género masculino. Los casos colombianos provenían de Cartagena (3), Bucaramanga (3), Guajira (1), Medellín (2) Bogotá (2), Barranquilla (1) y Cali (1). (Figura 28).

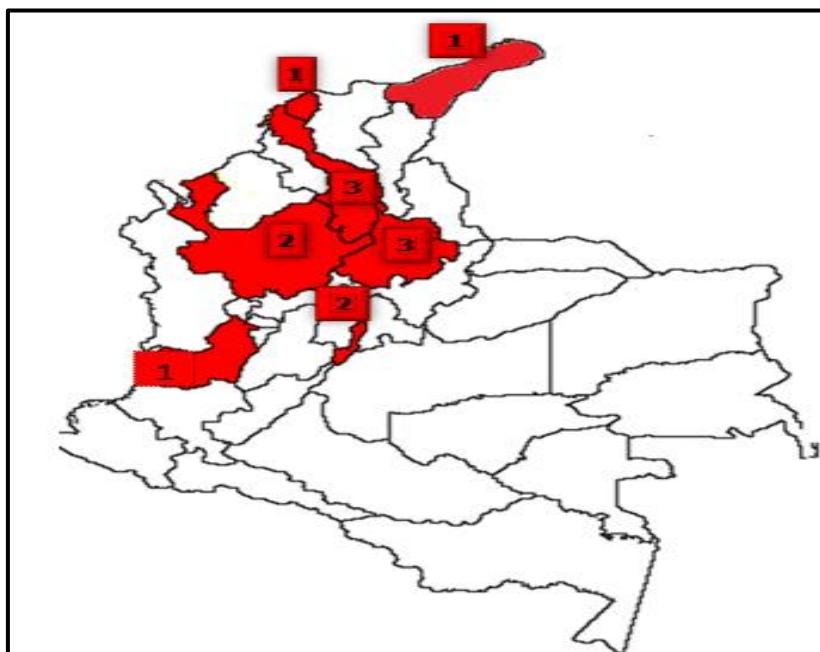


Figura 28. *Distribución Geográfica de la Enfermedad de Pompe en Colombia*

9.2 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS PACIENTES COLOMBIANOS CON EP

Los pacientes analizados tenían una edad promedio de inicio de síntomas de 15 años (SD: 10,7) y una edad promedio de diagnóstico de 24 años de edad (SD 13,5), 12 de estos presentaron EP de inicio tardío y uno de ellos enfermedad de Pompe clásica o de inicio temprano. Los síntomas iniciales para 11 de los 13 pacientes, fueron debilidad muscular proximal de predominio en miembros inferiores, 9 de los pacientes (81,8%) presentaron hipotonía, 1 (9,1%) presentó retraso del desarrollo motor 1 (9,1%), compromiso pulmonar, 8 (72,7%) presentaron debilidad muscular en extremidades inferiores, 2 (18,2%) requirieron el uso de silla de ruedas, 1 (9,1%) manifestó debilidad rápidamente progresiva; 10 (90,9%) no presentaron compromiso cardíaco y solamente 1 (9,1%) sí.

9.3 DETECCIÓN DE LAS MUTACIONES EN EL GEN GAA

El análisis de la secuencia de las regiones codificantes del gen GAA e IVS1, realizadas en 13 pacientes Colombianos con EP, reveló seis variantes de la secuencia previamente relacionadas con la patogénesis de la enfermedad: c.-32-13T>G, c.-32-2A>G, c.525delT (p.Glu176fsX45), c.1064T>C (p.Leu355Pro), c.2481+102_2646del (p.Gly828_Asn882del), y c.2560C>T (p.Arg854X).

La mutación más frecuentemente encontrada en este estudio fue c.-32-13T>G, con una frecuencia del 23,5%. Las siguientes mutaciones en frecuencia fueron c.2560C>T (p.Arg854X) y c.1064T>C (p.Leu355Pro), presentes en un 17,6 %; mientras que las restantes mutaciones fueron halladas en solo un paciente: 2481+102_2646del (p.gly828_Asn882del), c.-32-2A>G y c.525delT (p.Glu176fsX45), reportando por tanto una frecuencia del 5,9 % cada una.

Se encontraron dos nuevas variantes: c1106T>C (p.Leu369Pro) con una frecuencia del 17,6% y la otra nueva variante corresponde a c.2236 (p.Trp746Arg) con un frecuencia del 5.9%.

El Cuadro 20 resume las frecuencias alélicas y los respectivos porcentajes de cada una de las mutaciones previamente reportadas y de las dos nuevas variantes encontradas en este estudio.

Cuadro 20. *Frecuencias alélicas y porcentajes de cada una de las mutaciones*

Mutación	Alelos	Frecuencia alélica	%
c.-32-13T>G (empalme defectuoso)	4	0,24	23,5
c.1106T>C (p.Leu369Pro)	3	0,18	17,6
c.1064T>C (p.Leu355Pro)	3	0.18	17,6
c.2560C>T (p.Arg854X)	3	0,18	17,6
c.2481+102_2646del(p.gly828_Asn882del)	1	0,06	5,9
c.-32-2A>G (r.0?)	1	0,06	5,9
c.525delT (p.Glu176fsX45)	1	0,06	5,9
c.2236T>C (p.Trp746Arg)	1	0,06	5,9
Total	17	1.0	100

Entre las ocho diferentes mutaciones, se encontraron dos mutaciones que afectan el mRNA del splicing, tres mutaciones missense, una delección de una única base

causando cambio en el marco de lectura (frame shift), una gran delección que incluye el exón 18, y una mutación nonsense.

El paciente PD02 fue homocigoto para la mutación p.Leu369Pro y el paciente tres (PD03) fue heterocigoto compuesto para las dos variantes patogénicas c.-32-13T>G y c.525del (p.Glu176fsX45). Tres pacientes relacionados (PD04, PD05, PD06) compartieron el genotipo c.-32-2A>G/c.2481+102_2646del (p.Gly828_Asn882del). El paciente siete (PD07) fue heterocigoto compuesto para c.2560C>T (p.Arg854X) y c.-32-13T>G. El paciente ocho (PD08) fue homocigoto para la mutación c.-32-13T>G. los pacientes nueve y 10 (PD09, PD10) (hermanos) compartieron c.2560C>T (p.Arg854X), desafortunadamente nuestro sistema falló en encontrar la segunda mutación en estos dos pacientes. (Cuadro 21)

Cuadro 21. *Procedencia, subtipo de la enfermedad y genotipo de los pacientes afectados*

pt	Procedencia	Subtipo de EP	Nomenclatura HGV ADN	Nomenclatura HGV proteína
PD 01.	Bogotá	Inicio Tardío	c.1106T>C)/ c.1064T>C	p.Leu369Pro/ Leu355Pro
PD 02.	Bogotá	Inicio Tardío	c.1064T>C/ c.1064T>C	p.Leu355Pro/ p.Leu355Pro
PD 03	Guajira	Inicio Tardío	c.-32-13T>G/ c.525delT	Leaky splice/ p.Glu176fsx45
PD 04.	Bucaraman ga	Inicio Tardío	c.2481+102_2646del/ c.-32-2A>G	p.Gly828_Asn882del/ r.0?
PD 05.	Bucaraman ga	Inicio Tardío	c.2481+102_2646del)/ c.-32-2A>G	p.Gly828_Asn882del/ r.0?
PD 06.	Bucaraman ga	Inicio Tardío	c.2481+102_2646del/ c.-32-2A>G	p.Gly828_Asn882del/ r.0?

PD 07.	Cartagena	Inicio Tardío	c.2560C>T/ c.-32-13T>G	p.Arg854X Leaky splice
PD 08.	Barranquilla	Inicio Tardío	c.-32-13T>G/ c.-32-13T>G	Leaky splice/ Leaky splice
PD 09.	Cartagena	Inicio Tardío	c.2560C>T/ ¿???	p.Arg854X/ ???
PD 10.	Cartagena	Inicio Tardío	c.2560C>T/ ????	p.Arg854X/ ???
PD 11	Cali	Inicio Infantil	c.2560C>T/ c.2236T>C	p.Arg854X/ p.Trp746Arg
PD 12	Medellín	Inicio Tardío	c.1106T>C/ c.1106T>C	p.Leu369Pro/ p.Leu369Pro
PD 13	Medellin	Inicio Tardío	c.1106T>C/ c.1106T>C	p.Leu369P / p.Leu369Pro

Las letras en negrilla son las nuevas variantes encontradas, a los pacientes PD09 y PD10 (hermanos) no se les encontró mutación en el segundo alelo, los pacientes PD12 y PD13 (hermanos) fueron homocigotos para la nueva variante p.Leu369Pro.

Cuadro 22. *Efecto de las mutaciones encontradas en el estudio*

Mutación	Efecto
c.-32-13T>G	Potencialmente leve
c.1064T>C(p.Leu369Pro)	Desconocido
c.1064T>C (p.Leu355Pro)	Potencialmente menos severo
c.2560C>T (p.Arg854X)	Muy severo
c.2481+102_2646del(p.gly828_Asn882del)	Muy severo
525delT (p.Glu176fsX45)	Muy severo
c.-32-2A>G	Muy severo
c.2236T>C (p.Trp746Arg)	Desconocido

El efecto de las mutaciones son las reportadas en la base de datos de mutaciones de Enfermedad de Pompe (www.pompecenter.nl)

9.4 IDENTIFICACIÓN DE MUTACIONES NUEVAS

Se identificaron dos variantes de secuencia no reportadas previamente, c.1106T>C (p.Leu369Pro) con una frecuencia de 17,6%. Esta se encontro presente en tres afectados de dos familias con EP (Paciente PD01, PD12 y PD13) (Figura 29) y la variante c.2236T>C (p.Trp746Arg) que corresponde al 5,9% de las mutaciones encontrada en un solo caso de la enfermedad (PD11) (Figura 30). Los pacientes 12 y 13 (PD12 y PD13) fueron homocigotos para la nueva variante c.1106T>C (p.Leu369Pro) (Figura 31).

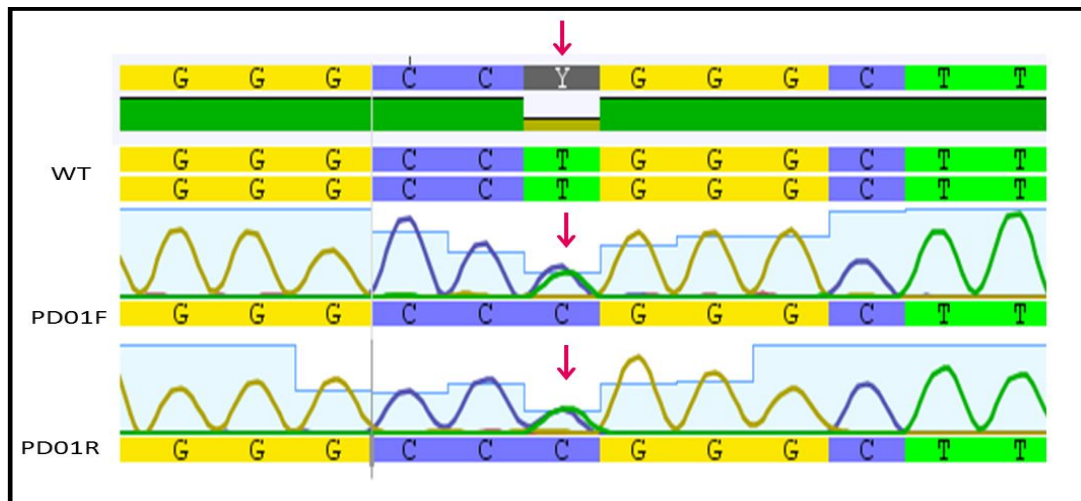


Figura 29. Alineamiento de la Secuencia GAA en el paciente PD01 .Con secuencia silvestre(Geneious version 5.0.): wt:(cDNA GAA sequence (EMBL/GenBank/DDBJ; accession number Y00839.1), P01R = reverse complement yP01F = forward sense. La fecha ilustra la variación c.1106T>C (pLeu369Pro).

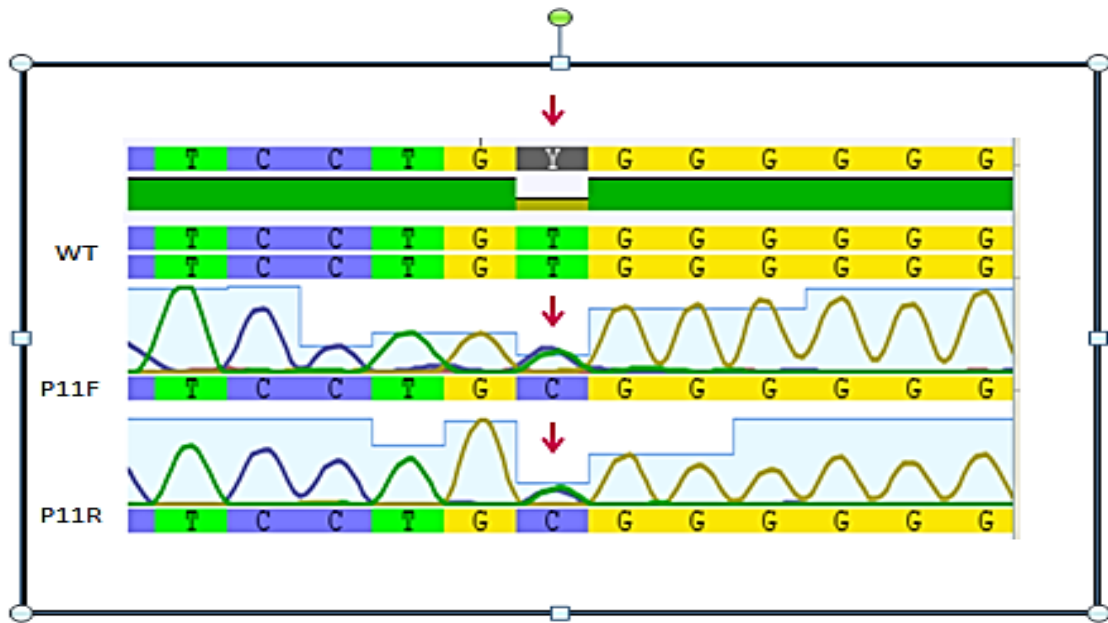


Figura 30. Alineamiento de la Secuencia GAA en el paciente PD11. Con secuencia silvestre (Geneious version 5.0.): wt: (cDNA GAA sequence (EMBL/GenBank/DDBJ; accession number Y00839.1), P11R =reverse complement y P11F = forward sense. La fecha ilustra la variación c.2236T>C (p.Trp746Arg)

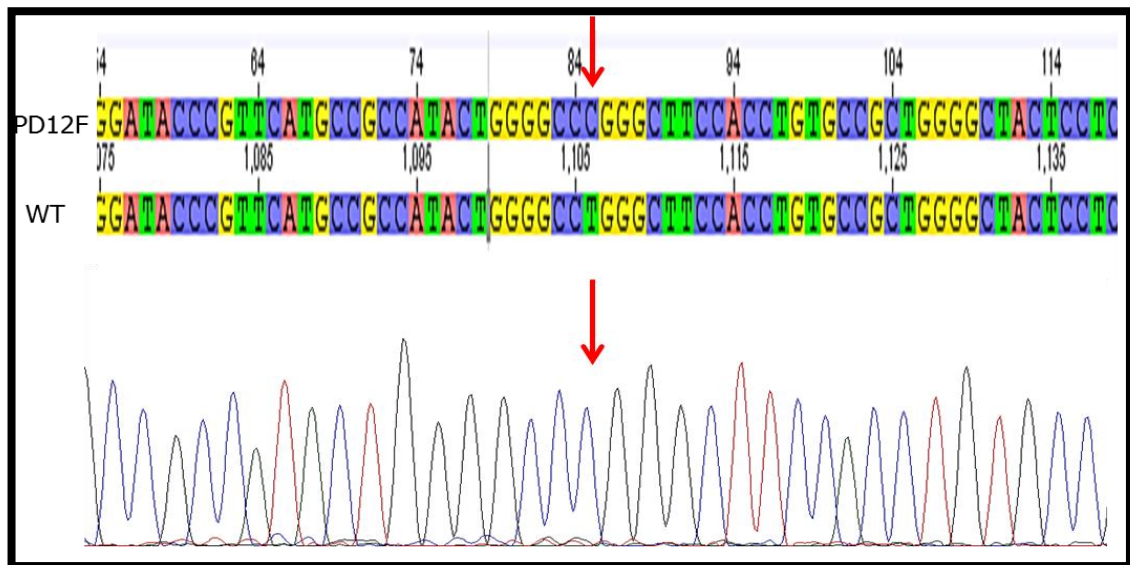


Figura 31. Alineamiento de la Secuencia GAA en el paciente PD12. Con secuencia silvestre (Geneious version 5.0.): wt: (cDNA GAA sequence (EMBL/GenBank/DDBJ; accession number Y00839.1), Cromatograma con Finch TV) P12F = forward sense. La fecha ilustra la variación del pe 12, homocigoto para c1106>T>C (p.Leu369Pro)

9.5 ANALISIS BIOINFORMATICO DE IMPACTO FUNCIONAL

9.5.1 Alineamiento múltiple

El alineamiento múltiple usando CLUSTAL 2.1 para las dos nuevas variantes (Figuras 32 y 33) analizo la homología de esta posición entre especies.

p.Leu369Pro	QYLDVVGYPFM	PPYW P GFHLC	RWGYSSTAITR
H.sapiens_WT	QYLDVVGYPFM	PPYW L GFHLC	RWGYSSTAITR
P.abelii	QYLDVVGYPFM	PPYW L GFHLC	RWGYSSTAITS
B.taurus	QYLDVVGYPFM	PPYW L GFHLC	RWGYSTSAITR
R.norvegicus	QYLDVVGYPFM	PPYW L GFHLC	RWGYSSSTAIVR
M.musculus	QYLDVVGYPFM	PPYW L GFHLC	RWGYSSSTAIVR

Figura 32. Alineamiento múltiple usando CLUSTAL 2.1 de la nueva variante **p.Leu369Pro**. La secuencia de la proteína GAA fue alineada y comparada con la versión wild type, *Pongo abelii*, *Bos taurus*, *Rattus norvegicus* y *Mus musculus*

p.Trp746Arg	EFPKDSSTWTV	DHQL L RGEALL	ITPVLQAGKA
H.sapiens_WT	EFPKDSSTWTV	DHQL L WGEALL	ITPVLQAGKA
P.abelii	EFPKDSSTWTV	DHQL L WGEALL	ITPVLQAGKA
B.taurus	EFPEDPSTWTV	DRQL L WGEALL	ITPVLEAEKV
R.norvegicus	EFPEDPSTWSV	DRQL L WGPALL	ITPVLEPGKT
M.musculus	EFPEDPSTWSV	DRQL L WGPALL	ITPVLEPGKT

Figura 33. Alineamiento múltiple usando CLUSTAL 2.1 de la nueva variante **p.Trp746Arg**. La secuencia de la proteína GAA fue alineada y comparada con la versión wild type, *Pongo abelii*, *Bos taurus*, *Rattus norvegicus* y *Mus musculus*

9.5.2 Predicción de efecto deletéreo

Se usaron cinco herramientas Bioinformáticas para predecir el efecto de las dos nuevas variantes c.1106T>C (p.Leu369Pro) y c.2236T>C (p.Trp746Arg). La primera herramienta fue PolyPhen2, con una puntuación en la confianza de predicción de 1.00, prediciendo **probabilidad de daño** para la mutación p.Leu369Pro, lo cual indica que esta substitución es probablemente perjudicial (Cuadro 17). La puntuación de 1.00 para la mutación p.Trp746Arg apunta a un efecto igualmente dañino, por tanto se podría predecir que afecta la función de la proteína o su estructura (Cuadro 17).

La aplicación de SIFT, produjo un puntaje menor de 0.05 para ambas mutaciones missense; p.Leu369Pro (figura número 27 muestra el puntaje de 0.00) y Trp746Arg (figura 28 muestra el puntaje de 0.00), indicando también, que la pérdida de función en ambas posiciones es muy probable (Cuadro 17).

La herramienta SNPs & GO predice la mutación relacionada a enfermedades humanas en la proteína con anotaciones funcionales. Para la mutación p.Leu369Pro mostró un efecto relacionado a enfermedad y un índice de confiabilidad de 10 (RI=10) (rango=0-10). Respecto a la otra nueva variante p.Trp746Arg esta aplicación predijo un efecto relacionado a enfermedad y un índice de confiabilidad de 10 (RI=10) (Cuadro 23).

Mut Pred clasifica si la substitución del aminoácido está asociado a enfermedad o es neutral en humanos. Esta herramienta muestra para la mutación p.Leu369Pro tiene un puntaje para la probabilidad de mutación deletérea (Puntaje general (g)) de 0.870, para las cinco características estructurales analizadas presentaron la siguiente puntuación: pérdida de estabilidad: p=0.019; ganancia de glicosilación en L369: p=0.036, ganancia de bucle=0.2045; ganancia de hélice=0.2662 y pérdida de uniones

MoRF=0.291; esta combinación de puntajes entre el puntaje general (g=0.870) y los puntajes de las características estructurales (p) dan como resultado una hipótesis confiable para pérdida de estabilidad con una p=0.019 (Cuadro 23).

Para la mutación p.Trp746Arg muestra un puntaje para la probabilidad de mutación deletérea (Puntaje general (g) de 0.882); las cinco características estructurales presentaron las siguientes puntuaciones: ganancia de metilación en Trp746: p=0.0127; pérdida del residuo catalítico: p=0.0997, ganancia de bucle=0.3485; pérdida de lámina=0.2662 y ganancia de desorden=0.2966; esta combinación de puntajes entre el puntaje general (g=0.870) y los puntajes de las características estructurales (p) dan como resultado una hipótesis confiable para la ganancia de metilación en Trp746 con una p=0.0127. (Cuadro 23).

Panther muestra que la probabilidad dada para la variante p.Leu369Pro causara un efecto deletéreo sobre la función de la proteína, donde el puntaje de subPSEC es <3 (subPSEC=0.5), un subPSEC menor de -3 es el punto de corte para que la mutación sea descrita como patogénica, entre más bajo sea mayor probabilidad existe la probabilidad de que sea deletérea, tal es el mismo caso para la otra variante p.Trp746Arg (subPSEC=0.5). (Cuadro 23).

Cuadro 23. Resumen de las predicciones usando herramientas bioinformáticas para las mutaciones p.Leu369Pro y C p.Trp746Arg

HERRAMIENTA BIOINFORMATICA	Mutation Nueva c.1106T>C p.Leu369Pro	Mutation Nueva c.2236T>C p.Trp746Arg
Polyphen2	-Confidencia de predicción: 1.00 -Predicción: Probabilidad de daño -Efecto: probablemente perjudicial	-Confidencia de predicción: 1.00 -Predicción: probabilidad de daño -Efecto: afecta la función de la proteína o su estructura

SIFT	-Puntaje: 0.00 -Predicción: pérdida de función	-Puntaje: 0.00 -Predicción: pérdida de función
SNP's &GO	-RI= 10 (Índice de confiabilidad) (rango=0-10) -Efecto: relacionado a enfermedad	-RI= 10 (Índice de confiabilidad) (rango=0-10) -Efecto: relacionado a enfermedad
Mut Pred	-Puntaje general (g): de 0.870 - Cinco características estructurales: 1.Pérdida de estabilidad: p=0.019 2.Ganancia de glicosilación en L369: p=0.036 3.Ganancia de bucle=0.2045 4.Ganancia de hélice=0.2662 5.Pérdida de uniones MoRF=0.291 -Resultado: hipótesis confiable para pérdida de estabilidad con una p=0.019	- Puntaje general (g): 0.882 -Cinco características estructurales: 1. Ganancia de metilación en Trp746: p=0.0127 2.Pérdida del residuo catalítico: p=0.0997 3.Ganancia de bucle=0.3485 4.Pérdida de lámina=0.2662 5.Ganancia de desorden=0.2966 -Resultado: hipótesis confiable para la ganancia de metilación en Trp746 con una p=0.0127
PANTHER	- subPSEC=0.5 -Efecto: deletéreo	-subPSEC=0.5 -Efecto: deletéreo

9.6 ANALISIS FUNCIONAL IN VITRO DE LAS MUTACIONES NUEVAS

Como un tercer método para estudiar el efecto de p.Leu369Pro y p.Trp746Arg, esas dos mutaciones fueron introducidas en el wild type cDNA GAA por mutagenesis-sitio dirigida y transitoriamente expresada en células embrionarias de riñón humanas (HEK293). En este experimento también se investigó el efecto de otras cuatro mutaciones previamente reportadas en la misma posición Trp746: p.Trp746X, p.Trp746Cys, p.Trp746Gly y p.Trp746Ser.

Setenta y dos horas después de la transfección, se recolecto el medio y las células para medir la actividad de alpha glucosidasa acida. Adicionalmente, la biosíntesis de la actividad de la alpha glucosidasa acida fue analizada realizando SDS-PAGE seguida de western blotting (Figura 34).

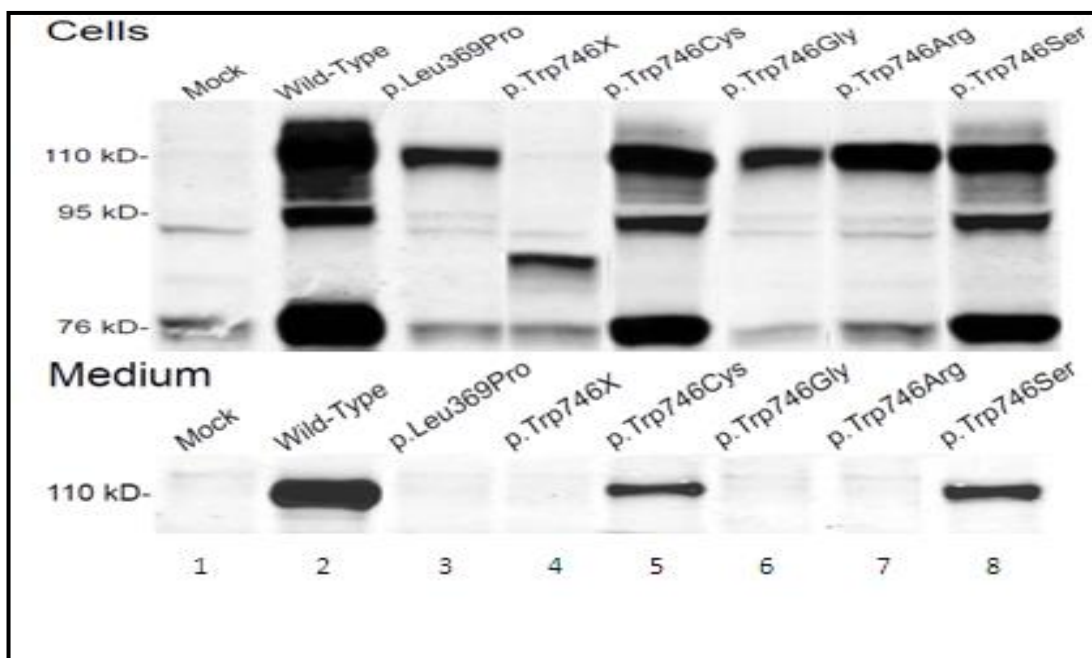


Figura 34. *Expresión Transitoria de mutantes GAA en células HEK293*. Las células embrionicas de riñón humanos (HEK293) fueron transfectadas con el wild type (pSHAG2) y constructos cDNA de GAA mutantes. 72 horas después de la transfección, el medio y las células fueron recolectadas y la alpha glucosidasa humana fue inmuno-precipitada para visualizar la biosíntesis y modificaciones post-traduccionales usando SDS-PAGE seguida de western blotting.

Las células Mock transfectadas no expresan alpha glucosidasa humana. La débil señal vista sobre el blot (pozo 1) debe ser interpretada como background de la tinción. La expresión transiente del constructo wild type cDNA GAA (pSHAG2) (pozo 2) lleva a síntesis *de novo* de un precursor de GAA de 110 KDa, esté es intracelularmente convertido en un procesado intermedio de 95KDa y en una enzima lisosomal madura de 76KDa (panel Superior: células). Algo de precursor es secretado en el medio

(panel inferior: medio). La substitución de aminoácidos p.Leu369Pro (pozo 3) y p.Trp746Arg (pozo 7) no inhibe la síntesis del precursor de 110 KDa, sin embargo, el transporte de alpha glucosidasa acida dentro de las células no ocurre, y el precursor no es secretado en el medio.

De acuerdo con esos resultados, casi no había actividad detectable de alpha glucosidasa en el medio y en las células transfectadas con los constructos p.Leu369Pro y p.Trp746Arg. p.Trp746X (pozo 4) resulta en la síntesis de un precursor truncado que es aparentemente estable como para ser visualizado, pero evidentemente no lleva a una enzima funcional. El efecto de p.Trp746Gly es similarmente severo como p.Leu369Pro y p.Trp746Arg. Las substituciones p.Trp746Cys y p.Trp746Ser son menos severas, pues no inhiben por completo la síntesis y las modificaciones post-traduccionales de la GAA (pozo 5 y 8).

En ambos casos la actividad fue medida en el medio y en las células (Cuadro 24). (Los cálculos se muestran en las Cuadros 25, 26 y 27). El sistema de puntuación es basado sobre el nivel de actividad de alpha glucosidasa acida en el medio y en las células y sobre la calidad de las diferentes especies moleculares que surgen durante las modificaciones post-traduccionales de la alpha glucosidasa acida, tal como fue descrito por Kroos et al, (Kroos, 2008). De acuerdo a este sistema de puntaje las dos nuevas mutaciones missense p.Leu369Pro y p.Trp746Arg se consideraron potencialmente menos severas, clase B (potentially less severe, class B). (Cuadro 24)

Cuadro 24. Variaciones en las secuencias analizadas por expresión in vitro

Cambio de nucleótido	Cambio de aminoácido	M 110	C110	C95	C76	M%	C%	Class
c.1106T>C	p.Leu369Pro	1,1	3,4	2,4	1,1	0.2	3.1	B
c.2238G>A	p.Trp746X	1,1	3,2	1,1	1,1	0	0	A

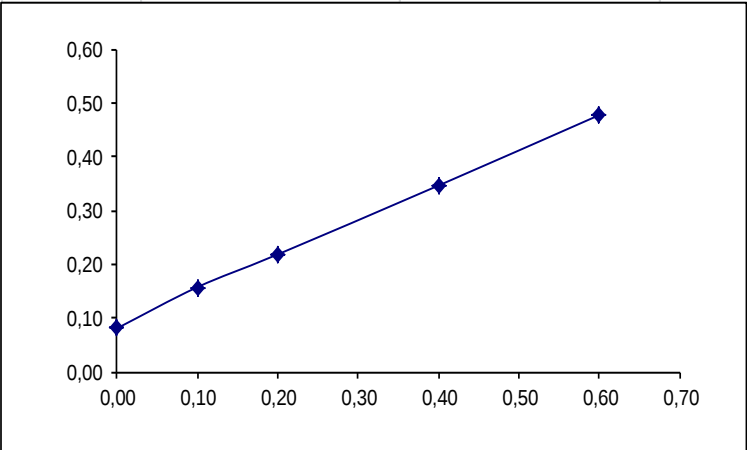
c.2238G>C	p.Trp746Cys	3,4	3,4	3,4	3,4	5.4	29.4	D
c.2236T>G	p.Trp746Gly	1,1	3,4	2,4	1,1	0	2.1	B
c.2236T>C	p.Trp746Arg	1,1	3,4	2,4	1,1	0	3.5	B
c.2237G>C	p.Trp746Ser	3,4	4, 4	3,4	3,4	8.2	40.1	E

Las dos nuevas mutaciones missense analizadas en este estudio son mostradas en negrilla.

9.7 EFECTO FUNCIONAL DE MUTACIONES

El resultado de los análisis funcionales para las dos nuevas variantes (mostradas en negrilla) muestran un efecto potencialmente menos severo (clase B); la severidad y el efecto de las otras variantes en la posición Trp746 obtenidos en este estudio se muestran en el Cuadro 28 y se comparan con los reportados previamente en la base de mutaciones de EP (www.pompecenter.nl), los cuales se predijeron por los resultados publicados de acuerdo a las características clínicas.

Cuadro 25. Curva de calibración a partir de absorbancias obtenidas de los diferentes constructos a partir de la medición enzimática de la proteína

Absorbancia 540 nm									
	calculo de proteina	prot mg/ml	medición 1	medición 2	promedio	Absorbancias			
		0,00	0,078	0,083	0,08				
		0,10	0,163	0,151	0,16				
		0,20	0,215	0,221	0,22				
		0,40	0,341	0,351	0,35				
		0,60	0,477	0,477	0,48				
1	pITA	0,38	0,338	0,329	0,33				
2	pSHAG20	0,29	0,282	0,275	0,28				
3	pSHAG2N	0,11	0,143	0,167	0,16				
4	pSHAG196-2	0,34	0,315	0,305	0,31				
5	pSHAG196-2	0,22	0,237	0,224	0,23				
8	pSHAG197-1	0,36	0,318	0,322	0,32				
9	pSHAG197-1	0,37	0,325	0,325	0,33				
12	pSHAG198-1	0,30	0,295	0,271	0,28				
13	pSHAG198-1	0,41	0,370	0,338	0,35				
14	pSHAG199-1	0,28	0,255	0,278	0,27				
15	pSHAG199-1	0,34	0,315	0,300	0,31				
16	pSHAG200-1	0,31	0,306	0,275	0,29				
17	pSHAG200-1	0,27	0,264	0,254	0,26				
18	pSHAG125-1	0,25	0,246	0,255	0,25				
19	pSHAG125-1	0,23	0,241	0,231	0,24				

Cuadro 26. Cálculos de la de la medición de la actividad enzimática de GAA en el medio (%) de los diferentes constructos analizados en este estudio

	Absorbancia 365/448	Metodo:4MU										
	α - Glu en medio	bl=	0,4 ((25/734)*750))*2	50*100)/1000	5-4.5	5.0/4.5				cambio de	cambio a	
nr	medicion 1	medicion 2	prom-blanco	pmol/10ml hr.	nmol/0.5 ml	-control neg	nmo/0.5ml/control neg	%WT	% actividad de GAA	nucleotido	nivel proteina	plasmido
1	22,9	22,3	22	45	4,5	0,0	1,0	0,0		control negativo		
2	29,7	30,3	30	60	6,0	1,5	1,3	1,7				
3	462,7	456,4	459	938	93,8	89,3	20,7	100,0		WT		
4	462,7	456,4	459	938	93,8	89,3	20,7	100,0				
5	25,5	24,6	25	50	5,0	0,5	1,1	0,6	0,2	c.1106T>C	p.Leu369Pro	196-2
6	21,8	21,2	21	43	4,3	-0,2	1,0	-0,3				
7	20,7	20,4	20	41	4,1	-0,4	0,9	-0,5	0,0	c.2238G>A	p.Trp746X	197-1
8	22,8	22,5	22	45	4,5	0,0	1,0	0,0				
9	45,2	45,2	45	92	9,2	4,6	2,0	5,2	5,4	c.2238G>C	p.Trp746Cys	198-1
10	47,7	47,5	47	96	9,6	5,1	2,1	5,7				
11	22,5	22,9	22	46	4,6	0,0	1,0	0,0	0,0	c.2236T>G	p.Trp746Gly	199-1
12	20,8	20,9	20	42	4,2	-0,4	0,9	-0,4				
13	21,8	21,7	21	44	4,4	-0,2	1,0	-0,2	0,0	c.2236T>C	p.Trp746Arg	200-1
14	22,5	22,4	22	45	4,5	0,0	1,0	0,0				
15	58,8	60,2	59	121	12,1	7,5	2,7	8,4	8,3	c.2237G>C	p.Trp746Ser	125-1
16	58,1	59,1	58	119	11,9	7,4	2,6	8,2				

Cuadro 27. Cálculos de la medición enzimática de GAA en las células (%) de los diferentes constructos analizados en este estudio

Abs 365/448	a glu	BCA	bl														
	en células		0,7		$((750 \times 900) / 743 \times 2)$					$((900/10)/1.72)$	menos promedio		nmol/mg hr/				
	medicion 1	medicion 2	promedio-bl	dilución	promedio-bl	pmol/10µl hr.	prot mg/ml	dilución	dilución x prot mg/ml	nmol/mg hr	prom	control neg	control -	%WT	%	plasmido n°	variante
1 mock	391	389	389	1	389	786	0,38	5,0	1,90	41	0,0	0	1	0,0	0,0	1 mock	
2 positive	4358	4305	4331	1	4331	8743	0,29	5,0	1,45	603	603	562	15	100	100	2 positive	
3(196-2)	444	449	446	1	446	900	0,34	5,0	1,72	52	59	11	1,3	2,0	3,1	3(196-2)	p.Leu369Pro
4(196-2)	360	352	355	1	355	717	0,22	5,0	1,11	65		23	1,6	4,2		4(196-2)	
5(197-1)	389	384	386	1	386	779	0,36	5,0	1,79	43	40,6	2	1,1	0,4	0	5(197-1)	p.Trp746X
6(197-1)	342	342	341	1	341	689	0,37	5,0	1,83	38		-4	0,9	-0,7		6(197-1)	
7(198-1)	1624	1618	1620	1	1620	3271	0,30	5,0	1,51	217	207	175	5,2	31	29	7(198-1)	p.Trp746Cys
8(198-1)	1997	1999	1997	1	1997	4032	0,41	5,0	2,05	196		155	4,7	28		8(198-1)	
9(199-1)	368	380	373	1	373	754	0,28	5,0	1,38	55	53	13	1,3	2,3	2,1	9(199-1)	p.Trp746Gly
10(199-1)	445	431	437	1	437	883	0,34	5,0	1,70	52		11	1,3	1,9		10(199-1)	
11(200-1)	450	412	430	1	430	869	0,31	5,0	1,57	55	61	14	1,3	2,5	3,5	11(200-1)	p.Trp746Arg
12(200-1)	439	430	434	1	434	876	0,27	5,0	1,33	66		25	1,6	4,4		12(200-1)	
13(125-1)	1973	1689	1830	1	1830	3695	0,25	5,0	1,26	293	272	252	7,1	45	41	13(125-1)	p.Trp746Ser
14(125-1)	1443	1405	1423	1	1423	2873	0,23	5,0	1,15	250		209	6,0	37,2		14(125-1)	

Cuadro 28. *Efecto funcional de las dos nuevas mutaciones y de las variantes en la posición p.Trp746*

Mutación	Clase	Severidad/año pompecenter	Clase	Severidad/ estudio actual
p.Leu369Pro	¿??	Desconocida	B	Potencialmente menos severa
p.Trp746Arg	¿???	Desconocida	B	Potencialmente menos severa
p.Trp746X	A	Muy severa/1998	A	Muy severa
p.Trp746Cys	C	Menos severa/1994	D	Potencialmente leve
p.Trp746Gly	¿??	Desconocida/2010	B	Potencialmente menos severa
p.Trp746Ser	B	Potencialmente menos severa/2008	E	Presumiblemente no patogénica

9.8 CORRELACION GENOTIPO/FENOTIPO

El paciente PD11 presenta EP de inicio infantil, mientras que los otros pacientes fueron clasificados con EP de inicio tardío. El Cuadro 29 describe el genotipo encontrado en los pacientes colombianos con EP y sus características clínicas.

Cuadro 29. *Genotipo y perfil clínico de los pacientes Colombianos con EP*

pt	Genotipo	Perfil clinico
PD01.	c.1106T>C(p.Leu369Pro)/ c.1064T>C(Leu355Pro)	Edad de inicio de síntomas: 1 año, edad de Dx: 5 años, Compromiso pulmonar, debilidad muscular en extremidades inferiors, soporte ventilatorio, hepatomegalia,bajo peso, dificultad de alimentación
PD02.	c.1064T>C (p.Leu355Pro)/ c.1064T>C(p.Leu355Pro)	Edad de inicio de síntomas: 6, edad de Dx: 11, Distrofia muscular cintura-miembro, uso de silla de ruedas, soporte ventilatorio, trastornos respiratorios durante el sueño.
PD03	c.-32-13T>G/ c.525delT (p.Glu176fsx45)	Edad de inicio de síntomas: 12 años, edad de Dx: 29, Distrofia muscular cintura-miembro, debilidad muscular en extremidades inferiores.
PD04.	c.2481+102_2646del (p.Gly828_Asn882del)/ c.-32-2A>G	Edad de inicio de sintomas:20 años, edad de Dx: 33 años, distrofia muscular cintura-miembro, debilidad en extremidades inferiores.
PD05.	c.2481+102_2646del(p.Gly828_Asn882del)/ c.-32-2A>G	Edad de inicio de síntomas: 19 años, edad de Dx:35 años, distrofia muscular cintura-miembro, debilidad muscular en extremidades inferiores,
PD06.	c.2481+102_2646del(p.Gly828_Asn882del)/ c.-32-2A>G	Edad de inicio de sintomas:17 años, edad de Dx: 36 años, distrofia muscular cintura-miembro, debilidad en extremidades

		inferiores.
PD07.	c.2560C>T(p.Arg854X) /c.-32-13T>G	Edad de inicio de síntomas: 27 años, edad de Dx:31,distrofia muscular cintura-miembro, debilidad en extremidades inferiores, ortopnea,
PD08.	c.-32-13T>G/ c.-32-13T>G	Edad de inicio de síntomas: 38, edad de DX:47, distrofia muscular cintura-miembro, debilidad en extremidades inferiores,ortopnea, fatiga ante esfuerzo,
PD09.	c.2560C>T (p.Arg854X)/???	Edad de inicio:10 años, edad de Dx: 19 años, distrofia muscular cintura-miembro, debilidad extremidades inferiores, soporte ventilatorio, trastornos durante el sueño
PD10.	c.2560C>T (p.Arg854X)/???	Edad de inicio de síntomas:15 años, edad de Dx:20, distrofia muscular cintura-miembro, soporte ventilatorio, uso de silla de ruedas, dificultad de alimentación.
PD11	c.2560C>T (p.Arg854X)/c.2236T>C (p.Trp746Arg)	Edad de inicio de síntomas:0.3 años, edad de Dx: 2 años,hipotonía, retraso del desarrollo motor,debilidad muscular rápidamente progresiva,soporte ventilatorio, cardiomiopatía, bajo peso, dificultad de alimentación
PD12	c.1106T>C (p.Leu369Pro)/ c.1106T>C (p.Leu369Pro)	No datos
PD13	c.1106T>C (p.Leu369Pro)/ c.1106T>C (p.Leu369Pro)	No datos

9.9 ANÁLISIS DE HAPLOTIPOS

También se identificaron variantes no patogénicas incluyendo dos polimorfismos en el intron 10, y siete mutaciones missense no deletéreas previamente descritas en varios exones. Cada una de esas variantes fue encontrada en uno o más pacientes en adición a las mutaciones patogénicas previas. (Cuadro 30)

Cuadro 30. *Genotipo y variantes encontradas en los pacientes PD07, PD08, PD09, PD10 Y PD11*

	PD07	PD08	PD9	PD10	PD11
Alelo 1	c.2560C>T p.Arg854X	c.-32-13T>G	c.2560C>T p.Arg854X	c.2560C>T p.Arg854X	c.2560C>T p.Arg854X
Alelo 2	c.-32-13T>G	c.-32-13T>G	?	?	c.2236T>C p.Trp746Arg
variante	c.596G>A c.668A>G c.1203A>G c.1374C>T c.1551+42G>A c.1551+49C>A c.1581A>G c.2338A>G c.2553A>G	c.596G>A c.668A>G c.1203A>G c.2338A>G c.2553A>G	c.596G>A c.668A>G c.1203A>G c.1374C>T c.1551+42G>A c.1551+49C>A c.1581A>G c.2338A>G c.2553A>G	c.596G>A c.668A>G c.1203A>G c.1374C>T c.1551+42G>A c.1551+49C>A c.1581A>G c.2338A>G c.2553A>G	c.596G>A c.668A>G c.1203A>G c.1374C>T c.1551+42G>A c.1551+49C>A c.1581A>G c.2553A>G

Esas variantes fueron asociadas al haplotipo previamente descrito y relacionado a la mutación más común en caucásicos c.-32-13T> (Cuadro 31) y al haplotipo relacionado con la mutación más común en africano-americanos p.Arg854X. (Cuadro 32)

Cuadro 31. *Haplótipos Colombianos más frecuentes asociados a c.-32-13T>G*

SNP	SNP IDs	c.-32-13T>G
c.596G/A	rs17410539	G
c.668A/G	rs11150843	A
c.1203A/G	rs1800304	A
c.2338A/G	rs3176968	A
c.2553A/G	rs1042397	A

Cuadro 32. *Haplótipos colombianos más frecuentes asociados a p.Arg854X*

SNP	SNP IDs	c.2560C>T (p-Arg854X)
c.596G/A	rs17410539	G
c.668A/G	rs11150843	A
c1203A/G	rs1800304	A
c.1374C/T		T
c.1581A/G	rs17407979	A
c.2154C/T		C
c,.2338A/G	rs3176968	A
c.2553A/G	rs1042397	A

10. DISCUSIÓN

10.1 MUTACIONES COMUNES EN LA POBLACIÓN A ESTUDIO

En un esfuerzo por delinear las características clínicas y moleculares de los pacientes colombianos con EP, se estudiaron 13 casos en nueve familias diferentes, a quienes se les realizó análisis genotípico. Se identificaron en este estudio seis mutaciones diferentes previamente relacionadas con la patogénesis de la enfermedad y dos variantes de la secuencia no reportadas en la literatura. Dentro de las seis mutaciones, dos afectan el *splicing* del mRNA de GAA (c.-32-13T>G y c.-32-2A>G), una mutación *missense* (c.1064C>T/p.Leu355Pro), una delección de una única base (c.525delT/p.Glu176fsX45), una gran delección que involucra el exón 18 (c.2481 + 102_2646del/p.gly828_Asn882del), y una mutación *nonsense* (c.2560 C > T/p.Arg854X). Las dos nuevas variantes corresponden a mutaciones *missense* (c.1106T>C (p.Leu369Pro) y c.2236T>C (p.Trp746Arg).

Se encontraron cuatro mutaciones comunes: la transversión c.-32-13T>G fue la mutación más frecuente en la población analizada (frecuencia alélica=0,24), presente en tres pacientes en estado heterocigoto u homocigoto (PD03, PD07, PD08) Esta es la mutación patogénica más común entre pacientes caucásicos (34-47%) (Kroos, 1995, Joshi, 2008, Herzog, 2012), controversialmente ha sido identificada en estado heterocigoto compuesto en un 71% (Boerkoel, 1995) asociada con EP de inicio tardío (Huie, 1994, KO, 1999, Hirschhorn, 2001). La mutación c.-32-13T>G reduce la fidelidad del *splicing* del mRNA de GAA, de tal manera que el exón 2 queda por fuera del empalme en un estimado entre el 80 al 90% de los eventos de *splicing* (Boerkoel, 1995) como resultado, los pacientes con un genotipo c.-32-13T>G/nulo tendrían en teoría solo 5-10% de actividad residual (Van der Ploeg, 2008).

En la práctica la actividad residual es más alta entre un 10-20% de actividad de (GAA) sugiriendo que esta mutación es leve y permite la síntesis de alfa glucosidasa

acida y una función al 20-40% del normal (Kroos, 1995). Estudios recientes han mostrado una presentación clínica y curso variable en heterocigotos compuestos c.-32-13T>G/nulo, lo cual indicaría que factores modificadores adicionales podrían tener un efecto substancial en el fenotipo clínico (Kross, 2007; Slonim, 2007). El hallazgo de la mutación c.-32-13T>G en un paciente menor de un año de edad (McCready, 2007) ejemplifica la extensa heterogeneidad clínica que puede ser secundaria a factores modificadores genéticos o no genéticos (Kroos, 2007).

En este estudio, los tres pacientes portadores de esta mutación iniciaron sus primeros síntomas de EP a las edades de 12, 27 y 38 años, reflejando esta variabilidad en la expresión fenotípica. Es importante destacar que los dos primeros pacientes son heterocigotos compuestos presentando como segunda mutación una variante patogénica de efecto muy severo p.Glu179fsX45 (PD03) y p.Arg854X (PD07), en ambos pacientes el compromiso muscular proximal en miembros inferiores y la ortopnea fueron los primeros síntomas de EP, pero la edad de inicio varió de manera significativa (12 vs 27 años) estos hallazgos fortalecen la noción de que el cuadro clínico de los pacientes portadores de la mutación c.-32-13T>G puede variar en términos de edad de inicio y tasa de progresión de la enfermedad debido a factores modificadores (Kroos, 2007, Huie, 1994).

El paciente PD08 quien presenta homocigocidad para c.-32-13T>G presentó sus primeros síntomas a la edad de 38 años y cursa con características clínicas leves. La homocigosidad para c.-32-13T>G es particularmente rara y solo tres casos han sido reportados hasta la fecha (Laforêt, 2000, Müller-felber, 2007). Al igual que el paciente analizado en este trabajo, los casos previamente descritos se asocian con formas de inicio tardío donde sus primeros síntomas iniciaron entre los 38 y 47 años. Es llamativo que con la frecuencia relativamente alta de esta mutación, sobretodo en población caucásica, no se hayan descrito más pacientes homocigotos, este ha llevado incluso a postular que estos presentan un alto nivel de actividad residual de GAA en esos que previene las manifestaciones clínicas (Kroos, 1995). Sin embargo, la

paciente homocigota presentaba signos clínicos y paraclínicos clásicos de la variante tardía. Como en previos estudios, la mutación c.-32-13T>G es asociada con curso leve aunque hay amplia variabilidad en la disminución locomotora y función respiratoria. Esto se confirma por el descubrimiento de otros pacientes homocigotos de c.-32-13T>G. (Laforet, 2000, Kroos, 2007, Montalvo, 2006; Herzog, 2012). Dado que los pacientes homocigotos han sido reportados de manera esporádica puede asumirse que el estado homocigoto de c.-32-13T>G tiene una expresividad variable (Laforet, 2000, Müller Felber, 2007, Sharma, 2005, Herzog, 2012),

Como un hallazgo relevante, esta paciente presenta cardiomiopatía hipertrofica, manifestación inusual en la EP de inicio tardío, sin embargo previos estudios han sugerido que una pequeña proporción de pacientes con Pompe de inicio tardío, (menor al 10%) tienen compromiso cardiaco, que incluye anormalidades electrofisiológicas e hipertrofia cardiaca, (Van Der Beek N, 2008; Soliman O, 2008) en este caso la anormalidad cardiovascular identificada puede estar relacionada a la EP, sin embargo no se pueden descartar otras comorbilidades que expliquen el compromiso cardiaco, como la hipertensión arterial, dada la edad de la paciente (47 años) (Forsha, 2011). Este hallazgo poco frecuente sustentaría, aún más, que la mutación c.-32-13T>G presenta una extensa heterogeneidad clínica que puede ser causada por factores modificadores secundarios.

Además de c.-32-13T>G, otras tres mutaciones fueron encontradas comúnmente en la muestra de pacientes colombianos: c.2560C>T (p.Arg854X), c.2481+102_2646del (p.gly828_Asn882del) y c.525delT (p.Glu176fsX45). La mutación p.Arg854X ha sido reportada como la más frecuente entre pacientes afro-americanos y tiene un efecto funcional muy severo, en donde el mRNA GAA mutado es difícilmente detectable (Becker, 1998; Hermans, 1993; Martiniuk, 1991). La mutación c.2560C>T es una transición de C>T en el di-nucleótidos CG, y por lo tanto un sitio susceptible a mutación recurrente (Becker, 1998). Produce un codón de parada prematuro llevando a una proteína truncada de 98KDa no funcional (Hermans, 1993).

Pacientes en estado homocigoto para esta mutación presentan un fenotipo infantil revelando que p.Arg854X manifiesta un efecto muy severo (Laforet, 2000; Kroos, 2008)

Esta mutación fue identificada en cuatro de los pacientes colombianos (PD07, PD09, PD010 y PD011) en estado heterocigoto. Aunque la homocigocidad para esta mutación se asocia con EP de inicio infantil, dada las dramáticas consecuencias para la síntesis de la proteína, los pacientes analizados iniciaron sus síntomas después de los 10 años de vida y no cursan con compromiso cardíaco (Laforêt, 2000, Kross, 2008). Esta variación puede ser debida a la actividad residual conferida por la mutación menos severa localizada en el segundo alelo.

El paciente PD07 portador de c.-32-13T>G, presenta una significativa actividad residual de GAA (6.1%) que aparentemente compensa el efecto deletéreo de la mutación p.Arg854X. Desafortunadamente, no se pudo establecer una correlación genotipo-fenotipo más precisa en los pacientes PD09 y PD10 (hermanos) en quienes, a pesar de la secuenciación de todas las regiones codificantes del gen GAA, incluyendo IVS1, no se encontró la segunda mutación. Sin embargo, el promotor, las regiones sin traducir 5' y 3' y casi todas las secuencias intrónicas fueron excluidas de este análisis. El caso PD11 fue clasificado con EP de inicio infantil, presentó sus primeros signos clínicos (hipotonía, retraso del desarrollo psicomotor) a los tres meses de edad. Este paciente es heterocigoto compuesto para p.Arg854X y la nueva mutación p.Trp746Arg, que es localizada en el dominio C-terminal proximal de GAA. Los alineamientos de la secuencia entre especies vertebradas mostraron una estricta conservación del triptófano en la posición 746 de la proteína GAA sugiriendo un rol funcional y esencia del aminoácido en esta posición. La substitución de Trp por Arg implica una drástica modificación en términos de propiedades fisicoquímicas.

En efecto, el triptófano es un aminoácido aromático no polar mientras que Arg es un residuo hidrofílico polar. Esas características fueron reforzadas por los resultados

obtenidos de las herramientas bioinformáticas SIFT, PolyPhen2, MutPred SNP's & GO y PANTHER las cuales predijeron un efecto deletéreo y esocia esta mutacion a enfermedad. Estos datos ayudan a explicar el fenotipo severo presente en el paciente PD011, en el cual dos mutaciones severas, producen un fenotipo de inicio temprano.

Las otras dos mutaciones comunes fueron, c.2481+102_2646del, también conocida como delexon18, y c.525delT, fueron inicialmente reportadas como dos mutaciones frecuentes en la población holandesa (Hirschhorn, 1999; Van der Kraan, 1994; Kroos, 1995). Sin embargo, ambas se han encontrado fuera de los países bajos en otras poblaciones caucásicas. En particular, delexon18 parece ser una mutación bastante común en el sur de Italia (Pittis, 2008; Dagnino, 2000).

10.2 VARIACIONES DE LA SECUENCIA, SU EFECTO, Y CORRELACIÓN GENOTIPO-FENOTIPO

El cuadro 27 resume el perfil clínico, los genotipos y la correlación genotipo-fenotipo de los 13 pacientes afectados con la enfermedad de Pompe. Los tres pacientes PD04, PD05 y PD06 provenientes de una misma familia proporcionan información importante con respecto al efecto de la mutación c.-32-2A>G previamente reportada por Kroos et al, (Kroos MA, 2008). Los tres pacientes presentan el genotipoc.-32-2A>G /c.2481+102_2646del. La mutación c.2481+102_2646del, resulta en la delección del exón 18 y regiones adyacentes del intron 17 y del 18. Los bordes de la delección están marcados por la presencia de ocho nucleótidos repetidos en tándem (AGGGGCCG), que juegan al parecer un papel mportante en el efecto de la mutación (Van der Kraan, 1994), esta variante es perjudicial para la estructura y función de la enzima (Kroos, 1995).

En si del18 es una mutación inframe que elimina 55 aminoacidos e inactiva la función de la proteína, previos estudios han mostrado que el aminoácido que codifica para el exón 18 es crucial para la maduración de GAA debido a que este exón

contienen sitios de clivajes proteolíticos para la producción de la enzima de 76KDa a partir del precursor intermedio de 96 KDa (Wisslar, 1993); de acuerdo a estos resultados se presume que esta delección causa pérdida de actividad de GAA tanto en adultos como en infantes al bloquear la maduración de GAA (Boerkoel, 1995). Esta mutación se ha reportado en diferentes pacientes con EP de inicio tardío y EP infantil (Boerkoel, 1995). Pacientes que presentan EP de inicio tardío cursan con una miopatía progresiva y falla respiratoria secundaria, sin embargo una enzima no funcional es hecha debido a la delección del exón 18 los afectados llegan a la edad adulta debido a las pequeñas cantidades de GAA conferidas por la segunda mutación ubicada en el otro alelo (Boerkoel, 1995). Se ha descrito que esta mutación está relacionada con un efecto muy severo produciendo un fenotipo de la enfermedad infantil.

Por otro lado, la mutación c.-32-2A>G afecta el *splicing* de GAA y fue descrita por Kroos et al, como una mutación muy severa de acuerdo a sus consecuencias a nivel molecular (Kroos, 2008). Los tres pacientes de este estudio con el genotipo c.-32-2A>G/ c.2481+102_2646del, contrario a la predicción funcional de Kroos, presentaron sus primeros síntomas entre los 17 y 20 años y fueron diagnosticados a las edades de 33, 35 y 36, respectivamente. De tal manera, que la mutación c.-32-2A>G, que originalmente se describió como de efecto severo, no se asocia necesariamente a un fenotipo drástico de EP.

En general, se puede concluir que una combinación de dos alelos con mutaciones completamente deletéreas lleva a la virtual ausencia de actividad de la enzima GAA y al fenotipo infantil severo. En este caso, una mutación severa en un alelo y una mutación leve en el otro resulta un fenotipo lentamente progresivo con una actividad residual de hasta un 23% en promedio; el fenotipo que ellos presentan podría ser explicado por la sumatoria de las dos mutaciones. Sin embargo, hay que tener en cuenta que en la EP el genotipo y la actividad enzimática no son siempre predictivos de la edad de inicio y de la progresión de la enfermedad (Kross, 2007).

Cuadro 27. Perfil clínico, genotipo y correlacion genotipo-fenotipo de los pacientes involucrados en este estudio.

Características	PD01	PD02	PD03	PD04	PD05	PD06	PD07	PD08	PD09	PD10	PD11	PD12	PD13
Genero	H	H	M	M	H	H	H	M	H	M	M	F	F
Edad 1° síntomas(años)	1	6	12	20	19	17	27	38	10	15	0,3	ND	ND
Edad de Dx (años)	5	11	29	33	35	36	31	47	19	20	2	ND	ND
Hallazgos clínicos													
Síntomas iniciales	compromiso pulmonar	distrofia muscular cintura-miembro	distrofia muscular cintura-miembro	distrofia muscular cintura-miembro	distrofia muscular cintura-miembro	distrofia muscular cintura-miembro	distrofia muscular cintura-miembro	distrofia muscular cintura-miembro	distrofia muscular cintura-miembro	distrofia muscular cintura-miembro	Hipotonía/retraso del desarrollo motor	ND	ND
Debilidad muscular	extremidades inferiores	uso de silla de ruedas	extremidades inferiores	extremidades inferiores	extremidades inferiores	extremidades inferiores	extremidades inferiores	extremidades inferiores	extremidades inferiores	uso de silla de ruedas	debilidad muscular rápida/progresiva	ND	ND
Problemas respiratorios	soporte ventilatorio	soporte ventilatorio	No	No	No	No	Ortopnea	Ortopnea/Fatiga ante esfuerzo	soporte ventilatorio en la noche	soporte ventilatorio	soporte ventilatorio	ND	ND
Cardiomiopatía Hipertrófica	No	No	No	No	No	No	No	Si	No	No	Si	ND	ND
Hepatomegalia	Si	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	ND	MD
Bajo peso	Si	No	No	No	No	No	No	No	No	No	Si	ND	ND
Condiciones asociadas	dificultades de alimentación	trastornos respiratorios durante el sueño	No	No	No	No	No	No	trastornos respiratorios durante el sueño	dificultades de alimentación	dificultades de alimentación	ND	ND

Mutaciones en GAA													
Alelo 1	c.1064T>C (p.Leu355Pro)	c.1064T>C (p.Leu355Pro) **	c-32-13T>G	c.2481+102_264 6del (p.Gly828_Asn882del)	c.2481+102_264 6del (p.Gly828_Asn882del)	c.2481+102_264 46del (p.Gly828_Asn882del)	c.2560C>T (p.Arg854X)	c-32-13T>G**	c.2560C>T (p.Arg854X)	c.2560C>T (p.Arg854X)	c.2560C>T (p.Arg854X)	c.1106T>C** (p.Leu369Pro)	c.1106T>C** (p.Leu369Pro)
							c.1581A>G (p.Arg527Arg)		c.1551+42A>G	c.1551+42A>G			
									c.1581A>G (p.Arg527Arg)	c.1581A>G (p.Arg527Arg)			
Alelo 2	c.1106T>C (p.Leu369Pro) *	c.1064T>C (p.Leu355Pro) **	c.525delT (p.Glu176fsx45)	c.-32-2A>G	c.-32-2A>G	c.-32-2A>G	c-32-13T>G	c-32-13T>G**	c.596G>A (p.Arg199His)	c.596G>A (p.Arg199His)	c.2236T>C (p.Trp746Arg) *		
							c.596G>A (p.Arg199His)		c.668A>G (p.His223Arg)	c.668A>G (p.His223Arg)	c.596G>A (p.Arg199His)	c.1106T>C** (p.Leu369Pro)	c.1106T>C** (p.Leu369Pro)
							c.668A>G (p.His223Arg)		c.2338A>G (p.Ile780Val)	c.2338A>G (p.Ile780Val)	c.668A>G (p.His223Arg)		
							c.1551+49A>C		c.2553A>G (p.Gly851Gly)	c.2553A>G (p.Gly851Gly)	c.2553A>G (p.Gly851Gly)		
							c.2338A>G (p.Ile780Val)		c.1551+42G>A	c.1551+42G>A	c.1551+49A>C		
Hallazgos de lab.													
CK (IU/L)	127	545	332	No datos	ND	No datos	488	912	977	736	350	ND	ND
AST/ALT (IU/L)	142/144	187/112	66/70	No datos	ND	No datos	56/46	46/44	125/118	213/154	226/180	ND	ND
% actividad inhibida	87,2	95,5	93,5	93,5	93,8	93,5	93,8	93,9	95,9	94,1	88,7	92,8	93,0

% actividad inhibida: el número se refiere al % de actividad de α -glucosidasa acida inhibida en leucocitos a pH 3.8 por la acarbosa (rango normal: 43.1 - 84.9 % inhibición; número de controles; n = 264) ND= no datos, *=nueva mutacion, **=homocigoto

La mutación p.Leu355Pro afecta el procesamiento normal y estabilidad de la enzima, los pacientes homocigotos para esta mutación presentan un fenotipo menos severo con actividad residual de GAA baja (Montalvo, 2004). El paciente PD02 presentó homocigosis para p.Leu355Pro, sus primeros síntomas iniciaron a la edad de seis años, y un porcentaje de actividad residual de 4.5% lo cual confirma la correlación genotipo-fenotipo previamente establecida para esta mutación, la cual es asociada con una presentación de EP de inicio en la primera infancia (efecto potencialmente menos severo, Clase B) (Labrousee, 2010; Montalvo, 2004)

10.3 NUEVAS VARIANTES DE LA SECUENCIA GAA

Estudios *in vitro* demostraron que los cambios estructurales conferidos por p.Trp746Arg no inhiben la síntesis del precursor de 110KDa pero afectan el procesamiento y el transporte intracelular de GAA. De acuerdo al sistema de puntuación de rango de severidad propuesto por Kroos et al (2008), los resultados argumentan en favor de una mutación potencialmente severa (Clase B). De acuerdo a estos resultados se esperaba que el porcentaje de actividad residual sea inferior al 10%.

La mutación, p.Leu369Pro fue la segunda nueva mutación identificada en este estudio. Esta fue encontrada en el PD01 en combinación con la mutación p.Leu355Pro, el paciente cursó con compromiso pulmonar desde la edad de un año y requirió soporte ventilatorio a los nueve años, presentando un porcentaje de actividad residual de 12.8%. La debilidad muscular fue especialmente severa. Los análisis *in vitro* para esta mutación sugirieron un efecto patogénico similar a p.Trp746Arg, basado en la estricta conservación del residuo Leu en la posición 369 entre especies vertebradas. Esta predicción fue validada por estudios funcionales donde la substitución del aminoácido parece obstaculizar las modificaciones post-traduccionales y el transporte intracelular de GAA. Según estos análisis se espera que

los pacientes portadores de esta mutación presenten un porcentaje de actividad residual similar al de p.Leu369Pro (mayor al 10%).

Esas predicciones basadas en la correlación genotipo-fenotipo son en ambos casos soportados por los análisis realizados en los programas PolyPhen y SIFT, MutPred SNP's & GO y PANTHER, así como también por los hallazgos obtenidos en los estudios de expresión *in vitro* realizados para estas dos nuevas mutaciones missense.

10.4 VARIANTES DE LAS SECUENCIAS ADICIONALES

Los estudios funcionales para la variante p.Trp746Gly mostraron resultados similares a p.Trp746Arg y p.Leu369Pro, demostrando que estos cambios no inhiben la síntesis del precursor de 110KDa, pero si afectan el procesamiento y el transporte intracelular de GAA. La mutación p.Trp746Gly fue encontrada durante un programa de tamizaje neonatal en un paciente con baja actividad de GAA (Labrousse, 2010) y fue clasificada por los hallazgos del presente trabajo como Clase B (potencialmente menos severa) y probablemente se asocie con un fenotipo de inicio tardío.

La variante p.Trp746Cys fue clasificada como potencialmente leve (clase D) y la variante p.Trp746Ser como presumiblemente no patogénica (clase E), dada la presencia del precursor de 110KDa al igual que las otras formas de GAA aunque en menor cantidad con respecto al normal. Actualmente existe controversia sobre la patogenicidad de p.Trp746Cys pues ha sido descrita tanto como un polimorfismo como por una mutación causal (Wan, 2008; Chien, 2011). Los resultados del análisis funcional están a favor de un efecto deletéreo leve ya que hay síntesis de la forma madura de 76 KDa y permite las modificaciones pos-traduccionales de la proteína.

Los estudios funcionales de la mutación p.Trp746X demostraron la presencia de un precursor truncado, que es aparentemente estable, suficiente para ser visualizado por western blotting, pero carece de actividad catalítica que la clasifica como clase A

(efecto muy severo). Esta situación corrobora previos hallazgos clínicos previos en donde portadores de esta mutación están afectados con EP infantil (Kishnani, 2006; Beesley, 1998).

10.5 ORIGEN ÉTNICO DE LAS MUTACIONES ANALIZADAS

Finalmente desde el punto de vista étnico, es de interés resaltar que las dos mutaciones más comunes encontradas en nuestro estudio son también comunes en Caucásicos (c.-32-13T>G) y Africanos (p.Arg854X). Notablemente, todos los pacientes Colombianos que presentan p.Arg854X comparten el haplotipo común para p.Arg854X (596A, 1203G, 1374T, y 2553G) previamente identificado en pacientes negros con EP provenientes de Estados Unidos, la costa Ivory, Ghana y Namibia (Becker, 1998, Hermans, 1993). Hallazgos que sugieren un origen común de la mutación p.Arg854X. Este haplotipo, fue el mismo que se encontró en los pacientes colombianos, aunque con c.1551+42G>A, c.1551+49A>C, y c.1581A>G (p.Arg527Arg) como variantes adicionales no reportadas previamente. Los pacientes colombianos que portan la mutación c.-32-13T>G comparten variantes de la secuencia adicionales (SNP-IDs: rs17410539, rs11150843, rs7225049, rs3176968, rs1042397, rs1042397), que en conjunto definen el haplotipo más común para c.-32-13T>G encontrado entre pacientes caucásicos con EP (Muller-Felber Wet, 2007; Kroos, 2007; Kroos, 2008). Esos resultados evocan una remarcable ascendencia Europea y afro-americana de la población Colombiana.

Los resultados de las cuatro mutaciones comunes c.-32-13T>G, p.Arg854X, c.525del,y delexon18, demuestran la remarcable ascendencia Europea y Afro-Americana de nuestra población. Étnicamente, los colombianos son una población muy diversa, incluyendo ancestros africanos de los grupos de raza negra que habitan actualmente el territorio colombiano, provenientes del Africa Occidental, debido a la llegada de esclavos africanos para labores forzadas en el siglo XVI, hecho que cambio dramáticamente el paisaje demográfico de la región. De los 12 millones de esclavos

africanos, menos de 600.000 llegaron a las costas de América del Norte. El comercio de los esclavos a América del Norte experimentó dos periodos fuertes: un poco antes de la revolución americana en 1776, y la segunda a comienzos del siglo XIX, justo antes de la aprobación de una ley que prohibió la importación de esclavos africanos en 1808 (Becker, 1998). Los primeros africanos esclavizados en el siglo XVI fueron pueblos provenientes de la región occidental del Atlántico. De los cuatro grupos étnicos africanos (Duékoué (Guéré-Cote DeÍvore); Accra (Ashanti-Ghana); Katsina (Hausa-Nigeria); Ovamboland (Ovambo-Namibia)) se conoce que actualmente que son portadores de la mutación p.Arg854X y tienen una historia de antigua interacción (Becker, 1998).

Esta situación, y la subsecuente mezcla de los negros, al igual que la de los indígenas con los colonizadores europeos, aumenta por lo tanto la posibilidad de hallar dentro de la población colombiana una gran variedad de linajes: no solo deben estar incluidas variantes de origen africano, sino europeas, principalmente españoles e italianos (Torroni, 1996; Salas, 2008). En este sentido y debido a su posición geográfica, Colombia constituye un importante eje en las rutas emprendidas por los primeros colonizadores de América. Lo anterior ha sido corroborado por resultados obtenidos de análisis de marcadores mitocondriales (mADN), que comparan la población colombiana con muestras de poblaciones europeas y africanas logrando demostrar que en nuestra población existe una contribución africana y europea (Salas, 2008).

En resumen, en este estudio se investigó la genética de la enfermedad de Pompe en la población colombiana y se identificaron dos nuevas mutaciones causales en el gen GAA, en adición a otras variaciones patogénicas previamente reportadas. Se aporta información adicional sobre la correlación genotipo-fenotipo, la cual se espera que facilite y mejore la asesoría genética de los individuos afectados y sus familias.

11. CONCLUSIONES

1. Se investigó la genética de la enfermedad de Pompe en la población Colombiana y se identificaron dos nuevas mutaciones causales en el gen *GAA*, en adición a otras variaciones patogénicas previamente reportadas.
2. La mutación más frecuentemente encontrada en este estudio fue c.-32-13T>G, con una frecuencia del 23,5%. Esta es la mutación más común entre pacientes caucásicos de forma de inicio tardío.
3. Estudios funcionales *in vitro* mostraron que los cambios estructurales conferidos por p.Leu369Pro y p.Trp746Arg no inhiben la síntesis del precursor GAA de 110 KD, pero afectan el procesamiento y el transporte intracelular de GAA.
4. La nueva mutación c.1106T>C (p.Leu369Pro) con una alta frecuencia (17,6%) en nuestra población, refleja un posible efecto fundador en el departamento de Antioquia (Medellín).
5. Estudios funcionales *in vitro* demostraron que p.Trp746Arg no es un polimorfismo si no una mutación.
6. La heterogeneidad mutacional refleja la diversidad étnica y clínica de la población Colombiana mostrando una ancestría Europea y Afro-Americana
7. A pesar de los estudios funcionales la correlación genotipo-fenotipo fue difícil de establecer.
8. Estudios como este ayudarán a mejorar el entendimiento en la correlación genotipo/fenotipo de la enfermedad de Pompe que facilitará la instauración de un programa de diagnóstico e una intervención temprana.

12. PERSPECTIVAS

1. Analizar el promotor y/o secuenciar RNA
2. Hacer un Constructo de expresión con todas las variables no patogenicas para tratar de demostrar si existe un efecto aditivo que explique el fenotipo de los pacientes a los quienes no se les encontro la segunda mutación.
3. Evaluar el estado del CRIM para tratar de correlacionar las mutaciones con la respuesta al tratamiento.

REFERENCIAS

- Amalfitano, A., et al. (2001). Recombinant human acid alpha-glucosidase enzyme therapy for infantile glycogen storage disease type II: results of a phase I/II clinical trial. *Genet Med*, 3(2), 132-138.
- An, Y., Young, S.P., Hillman, S.L., Van Hove, J.L., Chen, Y.T.& Millington, D.S. (2000). Liquid chromatographic assay for a glucose tetrasaccharide, a putative biomarker for the diagnosis of Pompe disease. *Anal Biochem*, 287(1), 136–143.
- An, Y. et al. (2005). Glucose tetrasaccharide as a biomarker for monitoring the therapeutic response to enzyme replacement therapy for Pompe disease. *Mol Genet Metab*, 85, 247–254.
- Ansong, A.K. et al. (2006). Electrocardiographic response to enzyme replacement therapy for Pompe disease. *Genet Med*, 8, 297–301
- Arad, M. et al. (2005). Glycogen Storage Diseases Presenting as Hypertrophic Cardiomyopathy. *The New England of Medicine*, 352(4), 362-72
- Ausems, M.G. et al. (1999). Glycogen storage disease type II: birth prevalence agrees with predicted genotype frequency. *Community Genet*, 2(2-3), 91-96.
- Ausems, M.G., et al. (1999). Frequency of glycogen storage disease type II in The Netherlands: implications for diagnosis and genetic counselling. *Eur J Hum Genet*, 7(6), 713-716.
- Bali, D.S., et al. (2012, 15 de febrero). Predicting cross-reactive immunological material (CRIM) status in Pompe disease using GAA mutations: lessons

learned from 10 years of clinical laboratory testing experience. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*, 160(1), 40-9.

Banugaria, S.G., et al. (2011). The impact of antibodies on clinical outcomes in diseases treated with therapeutic protein: Lessons learned from infantile Pompe disease. *Genet Med*, 13, 729 fro

Bashan, N., Potashnik, R., Barash, V., Gutman, A. & Moses, S.W. (1988, abril-mayo). Glycogen storage disease type II in Israel. *Isr J Med Sci*, 24(4-5), 224-7

Becker, J.A., et al. (1998, abril). The African origin of the common mutation in African American patients with glycogen-storage disease type II. *Am J Hum Genet*, 62(4), 991-994.

Beesley, C.E., Child, A.H. & Yacoub, M.H. (1998). The identification of five novel mutations in the lysosomal acid α -(1-4) glucosidase gene from patients with glycogen storage disease type II. Mutations in brief no. 134. *Hum Mutat*, 11(5), 413. ISSN 1059-7794

Berg, T.O., Fengsrud, M., Stromhaug, P.E., Berg, T., Seglen, P.O. (1998). Isolation and characterization of rat liver amphisomes. Evidence for fusion of autophagosomes with both early and late endosomes. *J Biol Chem*, 273, 21883–21892

Bijvoet, A.G., et al. (1999). Human acid α -glucosidase from rabbit milk has therapeutic effect in mice with glycogen storage disease type II. *Hum Mol Genet*, 8(12), 2145-2153.

Bodamer, O.A., Leonard, J.V. & Halliday, D. (1997). Dietary treatment in late-onset acid maltase deficiency. *Eur J Pediatr*, 156(Suppl 1), S39-42

- Bodamer, O.A., Halliday, D. & Leonard, J.V. (2000). The effects of l-alanine supplementation in late-onset glycogen storage disease type II. *Neurology*, 55(5), 710-712
- Bodamer, O., Haas, D., Hermans, M., Reuser, A. & Hoffmann, G. (2002). L-alanine supplementation in late infantile glycogen storage disease type II. *Pediatr Neurol*, 27(2), 145.
- Boerkoel, C.F., et al. (1995). Leaky splicing mutation in the acid maltase gene is associated with delayed onset of glycogenosis type II. *American Journal Human Genetics*, 56, 887-97
- Case, L.E., et al. (2008). Improvement with ongoing enzyme replacement therapy in advanced late-onset Pompe disease: A case study. *Mol Genet Metab*, 95, 233–35.
- Chamoles, N.A., Niizawa, G., Blanco, M., Gaggioli, D. & Casentini, C. (2004, septiembre). Glycogen storage disease type II: enzymatic screening in dried blood spots on filter paper. *Clin Chim Acta*, 347(1-2), 97-102
- Chien, Y.H. & Hwu, W.L. (2007, septiembre). A review of treatment of Pompe disease in infants. *Biologics*, 1(3), 195-201
- Chien, Y.H., et al. (2009). Pompe disease in infants: improving the prognosis by newborn screening and early treatment. *Pediatrics*, 124, e1116–25
- Chien, Y.H. et al. (2011). Later-onset Pompe disease: early detection and early treatment initiation enabled by newborn screening. *J Pediatr*, 158(6), 1023–1027.

- Cori, G.T. (1954). Enzymes and glycogen structure in glycogenosis. *Osterr Z Kinderheilkd Kinderfuersorge*.10(1-2), 38-42
- Corzo, D., Hwu, W., Mandel, H., Nicolino, M., Yong, F. & Kishnani, P. (2004).Natural history of infantile-onset Pompe disease: results from a retrospective chart review study. *Mol Genet Metab*.81, 170
- Dagnino, F., Stroppiano, M., Regis, S., Bonuccelli, G.,& Filocamo, M. (2000). Evidence for a Founder Effect in Sicilian Patients with Glycogen Storage Disease type II.*Hum Her*, 50, 331–333
- D'Ancona, G., Wurm, J. & Croce, C.M. (1979). Genetics of type II glycogenosis: assignment of the human gene for acid alpha-glucosidase to chromosome 17.*Proc. Nat. Acad. Sci*, 76, 4526-4529.
- De Duve, C. (1963). The lysosome.*Sci Am*, 208, 64–72.
- Den Dunnen, J.T. &Antonarakis, S.E. (2000). Mutation nomenclature extensions and suggestions to describe complex mutations: a discussion. *Hum Mutat*.15(1), 7-12.
- Di Rocco, M., Buzzi, D. & Tarò, M. (2007). Glycogen storage disease type II: clinical overview. *Acta Myologica*,27, 42-44
- Drost, M.R., Hesselink, R.P., Oomens, C.W. & Van der Vusse, G.J. (2005).Effects of non-contractile inclusions on mechanical performance of skeletal muscle.*J Biomech*, 38(5), 1035-1043.
- Finegold, D.N. & Bergman, I. (1988).High-protein feeding in an infant with Pompe's disease.*Neurology*, 38(5), 824-825.

- Forsha, D., Li, J.S., Smith, P.B., van der Ploeg, A.T., Kishnani, P. & Pasquali, S.K. (2011, Julio). Cardiovascular abnormalities in late-onset Pompe disease and response to enzyme replacement therapy. *Genet Med*, 13(7), 625-31
- Franco, L.M., et al. (2005). Evasion of immune responses to introduced human acid alpha-glucosidase by liver-restricted expression in glycogen storage disease type II. *Mol Ther*, 12(5), 876-884.
- Fuller, M., Van der Ploeg, A., Reuser, A.J., Anson, D.S. & Hopwood, J.J. (1995). Isolation and characterisation of a recombinant, precursor form of lysosomal acid alpha-glucosidase. *Eur J Biochem*, 234(3), 903-909.
- Fukuda, T., et al. (2006). Dysfunction of endocytic and autophagic pathways in a lysosomal storage disease. *Ann. Neurol*, 59, 700–708
- Griffin, J.L. (1984). Infantile acid maltase deficiency. I. Muscle fiber destruction after lysosomal rupture. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol*, 45, 23–36.
- Hagemans, M.L., et al. (2005, marzo). Clinical manifestation and natural course of late-onset Pompe's disease in 54 Dutch patients. *Brain*, 128(3), 671-7.
- Hagemans, M.L. (2006). Pompe disease in children and adults: natural course, disease severity and impact on daily life Results from an international patient survey. (Tesis). Cap. 1
- Halley, D.J., Konings, A., Hupkes, P. & Galjaard, H. (1984). Regional mapping of the human gene for lysosomal alpha-glucosidase by in situ hybridization. *Hum. Genet*, 67, 326-328.

Harrison's Principles of Internal Medicine. (2001). 15th ed. New York: McGraw-Hill. 404-407, 2524-2529. 2530-2539

Hers, H.G. (1963). Alpha-Glucosidase deficiency in generalized glycogen storage disease (Pompe's disease). *Biochem J*, 86, 11-6

Hermans, M.M., Kroos, M.A., van Beeumen, J., Oostra, B.A. & Reuser, A.J. (1991, 25 de Julio). Human Lysosomal alpha glucosidase, characterization of the catalytic site. *J Biol Chem*, 266 (21), 13507-12.

Hermans, M.M., et al. (1993). The conservative substitution Asp-645>Glu in lysosomal alpha-glucosidase affects transport and phosphorylation of the enzyme in an adult patient with glycogen-storage type II. *Biochem J*. 289, 687-693.

Hermans, M.M., Wisselaar, H.A., Kroos, M.A., Oostra, B.A. & Reuser, A.J. (1993, 1 de febrero). Human Lysosomal alpha glucosidase: Functional characterization of glycosylation sites. *Biochem J*, 289 (pt 3), 681-3

Hermans MM et al. Two mutations affecting the transport and maturation of lysosomal alpha-glucosidase in an adult case of glycogen storage disease type II. *Hum Mutat* 1993; 2(4): 268-273

Hermans, M.M., et al. (2004, enero). Twenty two novel mutations in the lysosomal alpha glucosidase gene (GAA) underscore the genotype-phenotype correlation in glycogen storage disease type II. *Human Mutation*, 23(1), 47-56

Hesselink, R.P., Wagenmakers, A.J., Drost, M.R. & Van der Vusse, G.J. (2003). Lysosomal dysfunction in muscle with special reference to glycogen storage disease type II. *Biochim Biophys Acta*, 1637(2), 164-170

- Herzog, A., et al. (2012, 7 de junio). Cross-sectional single-centre study on Pompe disease in 42 German patients: Molecular analysis of the GAA gene, manifestation and genotype-phenotype correlations. *Orphanet J Rare Dis*, 7(1), 35
- Hirschhorn, R. & Huie, M.L. (1999, enero). Frequency of mutations for glycogen storage disease type II in different populations: the delta525T and deltaexon18 mutations are not generally "common" in white populations. *J Med Genet*, 36(1), 85-6.
- Hirschhorn, R. & Reuser, A.J. (2001). Glycogen storage disease type II; acid alpha-glucosidase (acid maltase) deficiency. En Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W. & Valle, D. (ed.), *The metabolic and molecular bases of inherited disease*, (3389-3420). 8th ed. New York: McGraw-Hill.
- Hoefsloot, L.H., Hoogeveen-Westerveld, M., Kroos, M.A., van Beeumen, J., Reuser, A.J. & Oostra, B.A. (1988, junio). Primary structure and processing of lysosomal alpha-glucosidase; homology with the intestinal sucrase-isomaltase complex. *EMBO J*, 7(6), 1697-704
- Hoefsloot, L.H., Hoogeveen-Westerveld, M., Reuser, A.J. & Oostra, B.A. (1990) Characterization of the human lysosomal alpha-glucosidase gene; *Biochem. J*, 272, 493-497.
- Hoogeveen-Westerveld, M., et al. (2011, abril). Functional assessment of variants in the TSC1 y TSC2 genes identified in individuals with Tuberous Sclerosis Complex. *Hum Mut*, 32(4), 424-35

- Huie, M.L., et al. (1994, diciembre) Aberrant splicing in adult-onset glycogen storage disease type II (GSDII): molecular identification of an IVS1 (-13T>G) mutation in a majority of patients and a novel IVS10(+1GT>CT) mutation. *Human Mol Genet*, 3 (12), 2231-6.
- Joshi, P.R., et al. (2008). Molecular diagnosis of German patients with late-onset glycogen storage disease type II.
- Kanters, T.A., Hagemans, M.L., van der Beek, N.A., Rutten, F.F., van der Ploeg, A.T.&Hakkaart, L.(2001, octubre).Burden of illness of Pompe disease in patients only receiving supportive care.*J Inherit Metab Dis*, 34(5), 1045-52.
- Kemper, A.R., Hwu, W.L., Lloyd-Puryear, M. & Kishnani, P.S. (2007, noviembre). Newborn screening for Pompe disease: synthesis of the evidence and development of screening recommendations. *Pediatrics*, 120(5), e1327-34
- Kikuchi, T., et al. (1998).Clinical and metabolic correction of Pompe disease by enzyme therapy in acid maltase-deficient quail.*J Clin Invest*,101(4), 827-833
- Kishnani, P.S. & Howell Rodney, R. (2004, mayo).Pompe disease in Infant and Children.*The Journal of Pediatrics*, S35-S43
- Kishnani, P.S., et al. (2006, mayo).Pompe disease diagnosis and management guideline.*Genet Med*, 8(5), 267-88
- Kishnani, P.S., Hwu, W.L., Mandel, H., Nicolino, M., Yong, F. & Corzo, D.A. (2006, mayo).Retrospective, Multinational, Multicenter, Study on the Natural History of Infantile-Onset Pompe Disease.*The Journal of Pediatrics*, 148, 671-6

Kishnani, P.S., et al. (2006, julio). Chinese hamster ovary cell-derived recombinant human acid alpha-glucosidase in infantile-onset Pompe disease. *J Pediatr*, 149(1), 89-97.

Kishnani, P.S., et al. (2007, enero 9). Recombinant Human acid alpha glucosidase: Major clinical Benefit in infantile-onset Pompe disease. *Neurology*, 68(2), 99-109.

Kishnani, P.S., et al. (2009, septiembre). Early treatment with alglucosidase alpha prolongs long-term survival of infants with Pompe disease. *Pediatr Res*. 66(3), 329-35.

Kishnani, P.S., et al. (2010). Cross-reactive immunologic material status affects treatment outcomes in Pompe disease infants. *Mol Genet Metab*, 99, 26–33.

Ko, T.M., et al. (1999). Molecular Genetic Study of Pompe Disease in Chinese Patients in Taiwan. *Human Mutation*, 13, 380-384

Kroos, M.A., et al. (1995). Glycogen storage disease type II: frequency of three common mutant alleles and their associated clinical phenotypes studied in 121 patients. *J Med Genet*, 32(10), 836-837.

Kroos, M.A., et al. (2004). A case of childhood Pompe disease demonstrating phenotypic variability of p.Asp645Asn. *Neuromuscul Disord*, 14(6), 371-374.

Kroos, M.A., et al. (2007). Broad spectrum of Pompe disease in patients with the same c.-32-13T>G haplotype. *Neurology*, 68, 110-115.

- Kroos, M.A., et al. (2008). Update of the pompe disease mutation database with 107 sequence variants and a format for severity rating. *Human Mutation*, 29, E13-E26.
- Kroos, M., Hoogeveen-Westerveld, M., van der Ploeg, A., Reuser, A.J. (2012, 15 de febrero). The genotype-phenotype correlation in Pompe disease. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*, 160(1), 59-68.
- Kuo W.-L, Hirschhorn R, Huie ML, Hirschhorn K. Localization and ordering of acid alpha-glucosidase (GAA) and thymidine kinase (TK1) by fluorescence in situ hybridization. *Hum. Genet.* 97: 404-406, 1996.
- Labrousse, P., et al. (2010). Genetic heterozygosity and pseudodeficiency in the Pompe disease newborn screening pilot program. *Mol Genet Metab*, 99, 379–83
- Laforêt, P., et al. (2000, 24 de octubre). Juvenile and adult-onset acid maltase deficiency in France: genotype-phenotype correlation. *Neurology*, 55 (8), 1122-8.
- Lejeune, N., Thines Sempoux & Hers, H.G. (1963, enero). Tissue fractionation studies. 16. Intracellular distribution and properties of alpha-glucosidases in rat liver. *Biochem J*, 86, 16-21.
- Li, Y., et al. (2004). Direct multiplex assay of lysosomal enzymes in dried blood spots for newborn screening. *Clin Chem*, 50(10), 1785-1796.
- Lin, C.Y. & Shieh, J.J. (1996, marzo – abril). Molecular study on the infantile form of Pompe disease in Chinese in Taiwan. *Zhonghua Min Guo Xiao Er Ke Yi Xue Hui Za Zhi*. 37(2), 115-21

- Lin, C.Y., Ho, C.H., Hsieh, Y.H. & Kikuchi, T. (2002). Adeno-associated virus-mediated transfer of human acid maltase gene results in a transient reduction of glycogen accumulation in muscle of Japanese quail with acid maltase deficiency. *Gene Ther*, 9(9), 554-563
- Liou, W., Geuze, H.J., Geelen, M.J. y Slot, J.W. (1997).The autophagic and endocytic pathways converge at the nascent autophagic vacuoles. *J Cell Biol*.
- Martiniuk, F., et al. (1986).Isolation of a cDNA for human acid alpha-glucosidase and detection of genetic heterogeneity for mRNA in three alpha-glucosidase-deficient patients.*Proc.Nat. Acad. Sci*, 83, 9641-9644.
- Martiniuk, F., Ellenbogen, A., Hirschhorn, K.& Hirschhorn, R. (1985).Further regional localization of thegenes for human acid alpha glucosidase (GAA), peptidase D (PEPD), and alpha mannosidase B (MANB) by somatic cell hybridization.*Hum. Genet.* 69, 109-111,
- Martiniuk, F., et al.(1991, noviembre).Identification of a missense mutation in an adult-onset patient with glycogenosis type II expressing only one allele.*DNA Cell Biol*, 10(9), 681-7
- Martiniuk, F., Bodkin, M., Tzall, S.&Hirschhorn, R.(1991, mayo).Isolation and partial characterization of the structural gene for human acid alpha glucosidase.*DNA Cell Biol*, 10(4), 283-92
- Martiniuk, F., et al. (1998).Carrier frequency for glycogen storage disease type II in New York and estimates of affected individuals born with the disease.*Am J Med Genet*, 79(1), 69-72

- McCready, M.E., et al. (2007, diciembre). Development of a clinical assay for detection of GAA mutations and characterization of the GAA mutation spectrum in a Canadian cohort individuals with glycogen storage disease, type II. *Mol Genet Metab*, 92 (4), 325-35.
- Miller, S.A., Dykes, D.D. & Polesky, H.F. (1998, 11 de febrero). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells, *Nucleic Acids Research*, 16(3), 1215.
- Montalvo, A.L., et al. (2004, marzo). Glycogenosis type II: identification and expression of three novel mutations in the acid alpha-glucosidase gene causing the infantile form of the disease. *Mol Genet Metab*, 81(3), 203-8.
- Montalvo, A.L., et al. (2006). Mutation profile of the GAA gene in 40 Italian patients with late onset glycogen storage disease type II. *Hum Mutat*, 27, 999–1006.
- Moreland, R., et al. (2005, 25 de febrero). Lysosomal acid alpha glucosidase consist of four different peptides processed from a single chain precursor. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(8), 6780-91
- Muller-Felber, W. et al. (2007). Late onset Pompe disease: clinical and neurophysiological spectrum of 38 patients including long-term follow-up in 18 patients. *Neuromuscul Disord*, 17(9–10), 698–706.
- Oba-Shinjo, S.M., et al. (2009). Pompe Disease in a Brazilian series: clinical and molecular analysis with identification of nine new mutation. *J. Neurology*, 256(11), 1881-1890.
- Okumiya, T., et al. (2006, mayo). A new diagnostic assay for glycogen storage disease type II in mixed leukocytes. *Mol Genet Metab*, 88(1), 22-8

- Padberg, G.W., Wintzen, A.R., Giesberts, M.A., Sterk, P.J., Molenaar, A.J. & Hermans, J. (1989). Effects of a high-protein diet in acid maltase deficiency. *J Neurol Sci*, 90(1), 111-117.
- Pauly, D.F., Johns, D.C., Matelis, L.A., Lawrence, J.H., Byrne, B.J. & Kessler, P.D. (1998, abril). Complete correction de alpha glucosidas deficiency in pompe disease fibroblasts in vitro, and lisosomally targeted expression in neonatal rat cardiac and skeletal muscle. *Gene Ther*, 5(4), 473-780
- Pittis, M.G., et al. (2008). Molecular and functional characterization of eight novel GAA mutations in Italian infants with Pompe Disease. *Human Mutation*, 29:E27-E36.
- Poorthuis, B.J., et al. (1999). The frequency of lysosomal storage diseases in The Netherlands. *Hum Genet*, 105(1-2), 151-156.
- Raben, N., Plotz, P. & Byrne, B.J. (2002). Acid alpha glucosidase deficiency (Glycogenosis type II, Pompe disease). *Cur Mol Med*, 2, 145-166
- Raben, N., et al. (2003). Enzyme replacement therapy in the mouse model of Pompe disease. *Molecular Genetics and Metabolism*, 80(1-2), 159-69.
- Raben, N., Roberts, A. & Plotz, P.H. (2007, Julio). Role of autophagy in the pathogenesis of Pompe disease. *Acta Myol*, 26(1), 45-8.
- Raben, N., et al. (2010, diciembre). Differences in the predominance of lysosomal and autophagopathologies between infants and adults with Pompe disease: implications for therapy. *Mol Genet Metab*, 101(4), 324-331

- Reuser, A.J., Kroos, M., Willemsen, R., Swallow, D., Tager, J.M. & Galjaard, H.(1987, junio).Clinical diversity in glycogenosis type II: biosynthesis and in situ localization of acid alpha-glucosidase in mutant fibroblasts. *J. Clin. Invest*,79(6), 1689-1699
- Salas, A., Acosta, A., Alvarez-Iglesias, V., Cerezo, M., Phillips, C., Lareu, M.V. & Carracedo, A. (2008, septiembre – octubre). The mtDNA Ancestry of Admixed Colombian Populations.*Am J Hum Biol*, 20(5), 584-91
- Sharma, M.C., et al. (2005).Delayed or late-onset type II glycogenosis with globular inclusions. *Acta Neuropathol*,110, 151–157
- Shea, L., Raben, N. (2009). Autophagy in skeletal muscle: implications for Pompe disease. *Int J Clin Pharmacol Ther*, 47(Suppl 1), S42–S47.
- Slonim, A.E., et al. (1983).Improvement of muscle function in acid maltase deficiency by high-protein therapy. *Neurology*,33(1), 34-38
- Slonim, A.E. (1986). Myopathy in glycogenosis (GSD): positive responses to supplemental nutrient therapy (SNT).*Muscle Nerve*,9, S5189.
- Slonim, A.E., et al. (1990). High protein and exercise therapy (HPET) for childhood acid maltase deficiency (AMD). *J of Neurological Sciences*,98(Suppl.), A465.
- Slonim, A.E., et al. (2006, abril).Benign course of glycogen storage disease type IIb in two brothers.Nature or Nurture? *Muscle Nerve*,33(4), 571-4
- Slonim, A.E., et al. (2007, enero).Modification of the natural history of adult-onset acid maltase deficiency by nutrition and exercise therapy.*Muscle Nerve*, 35(1), 70-7.

- Sun, B., et al.(2005). Efficacy of an adeno-associated virus 8-pseudotyped vector in glycogen storage disease type II.*Mol Ther*,11(1), 57-65
- Sun, B.D., Chen, Y.T., Bird, A., Amalfitano, A. & Koeberel, D.D. (2003).Long-term correction of glycogen storage disease type II with a hybrid Ad-AAV vector.*Mol Ther*,7(2), 193-201.
- Soliman, O., et al. (2008).Cardiac involvement in adults with Pompe disease.*J Intern Med*, 264, 333–9.
- Solomon, E., Swallow, D. M., Burgess, S. & Evans, L. (1979). Assignment of the human acid alpha-glucosidase gene (alpha-GLU) to chromosome 17 using somatic cell hybrids.*Ann. Hum. Genet*, 42, 273-281.
- Sugawara, K., et al.(2009).Structural modeling of mutant α -glucosidases resulting in a processing/transport defect in Pompe disease. *Journal of Human Genetics*, 54, 324-330.
- Tinkle Brad, T. & Leslie, N. (2010). Glycogen Storage Disease Type II (Pompe Disease).*GeneReviews*.
- Tsujino, S., et al.(1998).Adenovirus-mediated transfer of human acid maltase gene reduces glycogen accumulation in skeletal muscle of Japanese quail with acid maltase deficiency. *Hum Gene Ther*,9 (11), 1609-1616.
- Torroni, A.,et al.(1996). Asian affinities and continental radiation of the four founding Native American mtDNAs.*Am. J. Hum. Genet*, 53, 563-590.

- Thurberg, B.L., et al. (2006). Characterization of pre- and post-treatment pathology after enzyme replacement therapy for pompe disease. *Lab. Invest*, 86, 1208–1220
- Umpleby, A.M., et al.(1987). Protein turnover in acid maltase deficiency before and after treatment with a high protein diet. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 50(5), 587-592.
- Uribe, A., España, M. & Murillo, P. (2009, diciembre). Estimation of neutral alpha-glucosidase activity in dried blood spot on filter paper, a parallel between children's and adult population. *Revist. Invest. Clin*, 61(Supl. 1), 60. ISSN: 0034-8376
- Van der Kraan, M., et al. (1994, 30 de septiembre). Deletion of exon 18 is a frequent mutation in glycogen storage disease type II. *Biochem Biophys Res Commun*, 203(3), 1535-41.
- Van Hove, J.L., Yang, H.W., Wu, J.Y., Brady, R.O. & Chen, Y.T. (1996). High-level production of recombinant human lysosomal acid alpha- glucosidase in Chinese hamster ovary cells which targets to heart muscle and corrects glycogen accumulation in fibroblasts from patients with Pompe disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(1), 65-70.
- Van Diggelen, O.P., et al.(2009, junio).Enzyme analysis for Pompe disease in leukocytes; superior results with natural substrate compared with artificial substrates. *J Inherit Metab Dis*, 32(3), 416-23.
- Van den Hout, H., Reuser, A.J., Vulto, A.G., Loonen, M.C., Cromme-Dijkhuis, A. & van der Ploeg AT.(2000). Recombinant human alpha-glucosidase from rabbit milk in Pompe patients. *Lancet*, 356, 397–398.

- van den Hout, H.M., et al. (2003, agosto). The natural course of infantile Pompe's Disease: 20 original cases compared with 133 cases from the literature. *Pediatrics*, 112(2), 332-40
- Van Der Beek, N., et al. (2008). Cardiac evaluation in children and adults with Pompe disease sharing the common c.-32-13T>G genotype rarely reveals abnormalities. *J NeuroSci*, 275, 46–50
- Van der Ploeg, A.T. & Reuser, A.J.J. (2008). Lysosomal Storage Disease 2. *Lancet*, 372, 1342-53
- Van Gijn & Gijssels, J.P. (2011). Pompe and his disease. *Ned Tijdschr Geneesk*, 155, A2878.
- Wan, L. (2008). Identification of eight novel mutations of the acid alpha-glucosidase gene causing the infantile or juvenile form of glycogen storage disease type II. *J Neurol*, 255(6), 831–838.
- Watson, J.G., Gardner-Medwin, D., Goldfinch, M.E. & Pearson, A.D. (1986). Bone marrow transplantation for glycogen storage disease type II (Pompe's disease). *N Engl J Med*, 314(6), 385
- Winkel, L., et al. (2004). Enzyme replacement therapy in late-onset Pompe's disease: A three-year follow-up. *Ann Neurol*, 55, 495–502.
- Winkel, L.P., et al. (2005). The natural course of non-classic Pompe's disease; a review of 225 published cases. *J Neurol*, 252, 875-84.

- Winchester, B., et al. (2008). Methods for a prompt and reliable laboratory diagnosis of Pompe disease: Report from an international consensus meeting. *Molecular Genetics and Metabolism*, 93, 275–281.
- Wisslar, H.A., Kroos, M.A., Hermans, M.M.P., van Beeuman, J. & Reuser, A.J.(1993). Structural and functional changes of lysosomal acid alpha-glucosidase during intracellular transport and maturation. *J. Biol. Chem*, 268, 2223-2231.
- Whitaker, C.H., Felice, K.J. & Natowicz, M. (2004). Biopsy-proven alpha-glucosidase deficiency with normal lymphocyte enzyme activity. *Muscle Nerve*, 29(3), 440-442
- Young, S.P., et al.(2012, 15 de febrero). Assessing disease severity in Pompe disease: the roles of a urinary glucose tetrasaccharide biomarker and imaging techniques. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*, 160(1), 50-8
- Zhang, H., et al. (2006). Comparison of maltose and acarbose as inhibitors of maltase-glucoamylase activity in assaying acid alpha-glucosidase activity in dried blood spots for the diagnosis of infantile Pompe disease. *Genet Med*, 8, 302–6.

ANEXOS

AnexoA. Consentimiento informado

COLEGIO MAYOR DE NUESTRA SEÑORA DEL ROSARIO
FACULTAD DE MEDICINA
GRUPO DE INVESTIGACION EN CIENCIAS BÁSICAS MÉDICAS
LÍNEA GENÉTICA HUMANA

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LA TOMA DE MUESTRAS
BIOLÓGICAS CON EL OBJETO DE REALIZAR UN TRABAJO DE
INVESTIGACIÓN

**TÍTULO DEL ESTUDIO: IDENTIFICACIÓN CARACTERIZACIÓN
FUNCIONAL DE MUTACIONES EN GAA EN PACIENTES
COLOMBIANOS AFECTADOS POR LA ENFERMEDAD DE POMPE**

Usted ha sido invitado a participar en un estudio de investigación, que tiene por objeto analizar la presencia de mutaciones, es decir alteraciones puntuales en un gen vinculado con las alteraciones de la enzima alfa glucosidasa ácida lisosómica. Este formato describe los beneficios y riesgos de participar en el estudio

Es muy importante que usted lea detenidamente y entienda ciertos puntos importantes en la realización de este estudio.

- a. La participación en este estudio es totalmente VOLUNTARIA
- b. La naturaleza de esta investigación, su propósito, sus limitaciones, sus riesgos, sus inconvenientes, incomodidades y cualquier información pertinente al resultado de este, le será explicada por el equipo de atención clínica.
- c. CONFIDENCIALIDAD: los riesgos médicos de cada individuo permanecerán archivados en el laboratorio de Biología Celular y Molecular de la universidad

del Rosario. Las historias médicas, los resultados de exámenes y la información que usted nos brinde son de carácter absolutamente confidencial, de manera que solamente usted y el equipo de atención clínica tendrá acceso a estos datos. Por ningún motivo se divulgará esta información sin su conocimiento.

- d. De acuerdo con lo establecido en la resolución 008430 de 1993 (normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud), este estudio puede ser clasificado como una "investigación con riesgo mínimo". Se cumplirá con lo establecido por el ministerio de proyección social colombiano (antiguo ministerio de salud), la ley 84 de 1989 y la ley 2381 de 1993
- e. Si tiene algún interrogante sobre el estudio por favor no dude en manifestarlos a alguno de los investigadores, quien con mucho gusto, contestará sus preguntas.

Cualquier información adicional usted puede obtenerla directamente con:

Dra Heidi Eliana Mateus

Unidad de Genética

e-mail: hmateus@urosario.edu.co

Teléfonos: 3474570 ext 266

EXPLICACION DEL PROYECTO DE INVESTIGACION AL INDIVIDUO

OBJETIVO:

El presente estudio analizará un gen específico para detectar alteraciones genéticas denominadas mutaciones. Estas mutaciones del gen analizado son las responsables de producir la enfermedad de Pompe en los afectados, además este estudio permitirá identificar a las personas portadoras que están en riesgo de transmitir la enfermedad.

PROCEDIMIENTO:

Se tomara una muestra de aproximadamente 5 ml de sangre mediante punción de vena periférica. En caso de que sea necesario repetir los exámenes, usted será notificado para tomar las muestras nuevamente. Estas muestras serán analizadas dentro y fuera del país únicamente por personas involucradas directamente en este proyecto y almacenadas en nuestro laboratorio.

RIESGOS E INCOMODIDADES:

la participación en este estudio representa riesgo mínimo para su salud e integridad y las molestias y efectos adversos estarán representadas exclusivamente por la toma de muestras referida en el procedimiento, algunas molestias pueden ser: hematomas, enrojecimiento y/o sensibilidad al tacto en el lugar donde se extrae la muestra, sin embargo, estas serán transitorias

BENEFICIOS:

La participación en el presente estudio le permitirá conocer la mutación causante de su enfermedad, adicionalmente, la identificación de una mutación genética en una familia permite que otros familiares consanguíneos determinen si comparten o no el mismo riesgo de presentar la enfermedad. Si presenta una mutación se le ofrecerá asesoría genética sobre cómo se hereda la enfermedad de Pompe y cuál es la probabilidad de que sus hijos y parientes consanguíneos puedan haber heredado la misma mutación en el gen específicamente estudiado en el presente estudio y en consecuencia no hay riesgo de que usted transmita esta mutación a sus hijos,

LIMITACIONES

Esta prueba analizará las mutaciones más frecuentes causantes de la enfermedad, otro tipo de mutaciones producidas por grandes regiones del gen duplicadas no pueden ser detectadas por esta técnica. Los resultados podrían ser útiles exclusivamente en función de la investigación y no proporcionar información adicional sobre su caso en particular. Las investigaciones buscan que en el futuro los resultados puedan ayudarle a usted y a su médico a tomar decisiones más informadas sobre su riesgo de tener hijos afectados y la posibilidad de iniciar un tratamiento temprano a los afectados

MANEJO DE RESULTADOS

Los resultados que se obtengan de la investigación se entregaran en una charla informativa al final del estudio. Adicionalmente si se encuentra una mutación, se le informara en una consulta con un medico genetista quien le contara sobre los riesgos de transmitir la enfermedad y los procedimientos familia y consultas adicionales que usted y su familia deben solicitar.

AUTORIZACION PARA LA TOMA DE MUESTRAS E INCLUSION VOLUNTARIA EN EL ESTUDIO: ANALISIS MOLECULARES EN PACIENTES COLOMBIANOS AFECTADOS POR LA ENFERMEDAD DE POMPE

Habiendo sido enterado(a) del contenido del presente estudio, informado(a) del objetivo del presente estudio y teniendo en cuenta que se han resuelto todas mis dudas acerca de la investigación. Yo _____ con documento _____ de _____ identificación numero: _____, en calidad de padre y/o representante legal del menor _____ acepto voluntariamente que se le tome una muestra de sangre, con el fin de realizar el análisis de un gen responsable de la presentación de la enfermedad de Pompe. Asi mismo, declaro que se me ha explicado la presencia de los riesgos y el manejo que se dara al material de muestra.

Firma _____ del _____ padre _____

Fecha _____

Cc _____ Fecha _____

Firma _____ de _____ la madre _____ Fecha _____

Cc_____ Fecha_____

Testigo 1

Nombre_____

Dirección_____

Teléfono_____

Parentesco_____

Firma_____

Cc_____

Testigo 2

Nombre_____

Dirección_____

Teléfono_____

Parentesco_____

Firma_____

Cc_____

Investigador_____Bogota D.C,

Fecha_____

AnexoB. Mutagenesis *in vitro*

Se uso el kit QuickChange Site-directed Mutagenesis de stratagene no 200516

BUFFERS

-primers forward y revers 100 µl: en refrigerador a -20C

- pSHAG2: 10 ng/µl (-20°C)

- dNTP mix: 10 mM (-20°C)

-QW

-Buffer de reaccion 10X (-20°C)

-PfuTurboTM DNA polymerase: 2.5 U/µl (-20°C)

-enzima de restriccion DpnI (-20°C)

-celulas competentes (-80°C)

-AMP 10X (-20°C)

- IPTG: 100mM=10X

- X-Gal: 20 mg/ml=250X (-20°C)

-NZY + caldo: stock:

10g de hidrolisado de caseina

5 g de extracto de levadura

5 g de NaCl

pH 7.5 en 1 L de agua

autoclavar dejar enfriar y agregar

12,5 ml de 1M MgCl₂ (autoclave)

12,5 ml de 1M MgSO₄ (filtro estéril)

10 ml de 20% (w / v) de glucosa (filtro estéril)

Anexo C.

Recoleccion del medio y celulas, determinacion en 4MU y BCA, PAGE y blotting

BUFFERS

-Buffer de lisis:

2,5 ml 1M Tris (pH7,5-8)

1 ml 5M NaCl

5 ml 0,5M NaF

2,5 ml 20% TritonX100

1 comprimido de inhibidor de proteasa EDTA llevarlo hasta 50 ml con H₂O

-0,2 M NaAc pH 4,1

-SUSTRATO 4 MU

-20°C 4MU- α -D glucopyranoside

-Stop Buffer

MOPS

Stock 20X (20,9 g de MOPS, 121 g de Tris base se disuelve en conjunto en 0,6 litros)

Añadir 200 ml al 10% o 100 ml al 20% de SDS y 41 ml de 500 mM de EDTA Na₂ (20,5 mM). Ajustar el pH a 7,7 con 1 M de citrato y diluir hasta 1 litro

-Buffer para las muestras lisadas

5 ml de buffer

10 ml de glicerol

2 ml 2-mercaptoetanol

10 ml 20% SDS

10 μ l 2,5% de azul de bromofenol

Llevarlo a 50 ml con H₂O

-blot buffer

Stock 10X. Por litro 200 ml MeOH y 100 ml stock (mantener a 4°C)

Identification and Functional Characterization of *GAA* Mutations in Colombian Patients Affected by Pompe Disease

Mónica Yasmin Niño • Heidi Eliana Mateus • Dora Janeth Fonseca •
Marian A. Kroos • Sandra Yaneth Ospina • Juan Fernando Mejía •
Jesús Alfredo Uribe • Arnold J. J. Reuser • Paul Laissue

Received: 27 January 2012 / Revised: 27 January 2012 / Accepted: 24 February 2012
© SSIEM and Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2012

Abstract Pompe disease (PD) is a recessive metabolic disorder characterized by acid α -glucosidase (*GAA*) deficiency, which results in lysosomal accumulation of glycogen in all tissues, especially in skeletal muscles. PD clinical course is mainly determined by the nature of the *GAA* mutations. Although ~400 distinct *GAA* sequence variations have been described, the genotype-phenotype correlation is not always evident.

In this study, we describe the first clinical and genetic analysis of Colombian PD patients performed in 11 affected individuals. *GAA* open reading frame sequencing revealed eight distinct mutations related to PD etiology including two

novel missense mutations, c.1106 T > C (p.Leu369Pro) and c.2236 T > C (p.Trp746Arg). In vitro functional studies showed that the structural changes conferred by both mutations did not inhibit the synthesis of the 110 kD *GAA* precursor form but affected the processing and intracellular transport of *GAA*. In addition, analysis of previously described variants located at this position (p.Trp746Gly, p.Trp746Cys, p.Trp746Ser, p.Trp746X) revealed new insights in the molecular basis of PD. Notably, we found that p.Trp746Cys mutation, which was previously described as a polymorphism as well as a causal mutation, displayed a mild deleterious effect. Interestingly and by chance, our study argues in favor of a remarkable Afro-American and European ancestry of the Colombian population. Taken together, our report provides valuable information on the PD genotype-phenotype correlation, which is expected to facilitate and improve genetic counseling of affected individuals and their families.

Communicated by: Robin Lachmann

Competing interests: None declared.

Authors Mónica Yasmin Niño and Heidi Eliana Mateus contributed equally to this work.

M.Y. Niño • H.E. Mateus • D.J. Fonseca • S.Y. Ospina • P. Laissue
Unidad de Genética, Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud,
Universidad del Rosario, Bogotá, Colombia

M.Y. Niño • M.A. Kroos • A.J.J. Reuser
Department of Clinical Genetics, Center for Lysosomal and
Metabolic Diseases, Erasmus MC, Rotterdam, The Netherlands

J.F. Mejía
Fundación Valle de Lili, Cali, Colombia

J.A. Uribe
Departamento de Ciencias Biológicas, Universidad de los Andes,
Bogotá, Colombia

A.J.J. Reuser (✉)
Department of Clinical Genetics, Erasmus MC University
Medical Center, Dr Molewaterplein 50,
3015 GE, Rotterdam, The Netherlands
e-mail: a.reuser@erasmusmc.nl

Introduction

Pompe disease (PD) is a rare autosomal recessive metabolic disorder characterized by acid α -glucosidase (*GAA*) deficiency. This enzyme catalyzes the hydrolysis of the α -1,4 and α -1,6-glucosidic bonds of glycogen, and its deficiency results in lysosomal glycogen storage in all tissues, especially in skeletal muscles. Clinically, PD patients display a broad spectrum of phenotypes with regard to the age of onset, the disease progression rate, and the severity of symptoms (van der Ploeg and Reuser 2008; Raben et al. 2007; Hirschhorn et al. 2001). The infantile form of PD includes severely affected infants (under 1 year of age) who display a combination of generalized skeletal muscle weakness and cardiac hypertrophy that provoke cardio-

respiratory failure and death (Kishnani et al. 2006; van den Hout 2003). Conversely, patients with childhood, juvenile, and adult onset of symptoms lack cardiac involvement. These individuals exhibit a less severe skeletal muscle dysfunction with slowly progressive proximal myopathy as well as a marked involvement of respiratory muscles (Hirschhorn et al. 2001; van der Ploeg 2008; Müller-Felber et al. 2007; Laforêt et al. 2000). The *GAA* gene contains 19 coding exons. At the protein level, human GAA is composed of five distinct regions: trefoil type-P, N-terminal β -sandwich, catalytic (β/α)₈ barrel, proximal C-terminal, and distal C-terminal domains. The key catalytic residues are located at Asp518 and Asp616 (Sugawara et al. 2009). GAA is synthesized as an inactive precursor of 110 kD which is subsequently transported to the pre-lysosomal and lysosomal compartments via the mannose 6-phosphate receptor. En route, it is processed to a 95 kD intermediate and subsequently to fully active forms of 76 and 70 kD (Hirschhorn et al. 2001).

From an etiological point of view, PD is caused by *GAA* mutations that determine the degree of enzyme deficiency and largely the clinical course (Kroos et al. 2008; Reuser et al. 1987). Disease-causing sequence variations have been described along the entire length of the gene including missense and nonsense mutations, splice site variants, and partial insertions/deletions. At present, the Pompe Disease Mutation database (www.pompecenter.nl) lists 393 *GAA* sequence variations. Among these, 54 are of unknown effect, 75 are considered as nonpathogenic, 2 are probably nonpathogenic, and 257 are confirmed as etiological (Oba-Shinjo et al. 2009; <http://www.pompecenter.nl>). Several in vitro studies have permitted to propose distinct molecular mechanisms underlying PD etiopathology (Kroos et al. 2008). The majority of pathogenic missense mutations seem to affect folding, posttranslational processing, and/or intracellular transport of GAA which partially or completely abolishes its function (Pittis et al. 2008; van der Ploeg and Reuser 2008).

Some *GAA* mutations seem to have spread through a founder effect. African American patients originating from the north of Africa frequently present c.2560 C > T (p.Arg854X) and Asian patients c.1935 C > A (p.Asp645Glu) sequence variants (Becker et al. 1998). Common mutations among Caucasian patients include c.2481 + 102_2646del (delexon18; p.Gly828_Asn882del), c.525del (delT525; p.Glu176fsX45), and c.925 G > A (p.Gly309Arg) (Hirschhorn et al. 2001; Kroos et al. 2008; Raben et al. 1999). The c.-32-13 T > G mutation, which reduces the *GAA*-mRNA splicing fidelity, is the most common *GAA* pathogenic sequence variant among Caucasian adults and children with a slowly progressive course of the disease (Boerkoel et al. 1995; Huie et al. 1994). The GAA residual activity in patients presenting the c.-32-13 T > G/null genotype is usually reduced to 5–25% of

average normal (van der Ploeg and Reuser 2008; Kroos et al. 2007). Some patients with this genotype manifest symptoms in early childhood, whereas others remain presymptomatic until late adulthood. This demonstrates the role of modifying factors in PD pathophysiology (Pittis et al. 2008; Kroos et al. 2007; Slonim et al. 2007).

In this study, we describe the first clinical and genetic analysis of Colombian PD patients performed in 11 affected individuals who belong to 8 families. Direct sequencing of the complete *GAA* open reading frame revealed eight distinct mutations related to PD etiology. Two novel missense mutations were investigated for their functional effect along with four previously described mutations to obtain a better understanding of the disease pathophysiology. Interestingly and by chance, our study argues in favor of a remarkable Afro-American and European ancestry of the Colombian population.

Material and Methods

Patients

PD patients (pt) who belong to eight distinct families were included in this study. These individuals originate from five different Colombian cities: Cartagena, Barranquilla, Bucaramanga, Medellín, and Bogotá. As previously described, PD diagnosis was performed by quantifying GAA activity from peripheral blood leukocytes using 4-methylumbelliferyl- α -D-glucoside as substrate (Li et al. 1985). Maltase-glucoamylase activity was inhibited with 120 μ mol/L of acarbose. For each patient, GAA activity was assayed in the presence and absence of acarbose at pH 3.8. More than 85% inhibition confirms PD (Palmer et al. 2007). The age at diagnosis ranged from 2 to 47 years and the initial symptoms were mostly related to limb girdle weakness (LW) (Table 1). Ten patients (pt 1 to pt 10) experienced first symptoms in childhood or adulthood. One patient (pt 11) was diagnosed at 4 months of age since he displayed hypotonia and delayed motor development. Pt 4, 5, and 6 belong to one family. The same holds for patients 9 and 10. In all the cases, parents of the patients were included in the study in order to evaluate the segregation of the *GAA* mutations. All participants in the study provided written informed consent. The Institutional Ethics Committee of each participating institution approved the clinical and experimental aspects of the study.

GAA Mutational Analysis

Genomic DNA was extracted from whole blood samples using standard procedures. In all patients, the complete *GAA* open reading frame (19 exons) was amplified by PCR as previously described (Becker et al. 1998). Each amplicon

Table 1 Phenotypes and Genotypes of Colombian Pompe Disease Patients

	Patient 1	Patient 2	Patient 3	Patient 4	Patient 5	Patient 6	Patient 7	Patient 8	Patient 9	Patient 10	Patient 11
<i>Clinical features</i>											
Gender	M	M	F	F	M	M	M	F	M	M	M
First symptoms (years)	1.1	6	12	20	19	17	27	38	10	15	0.3
Age at diagnosis (years)	5	11	29	33	35	36	31	47	19	20	2
Initial clinical signs	PI	LW	LW	LW	LW	LW	LW	LW	LW	LW	HDMD
Muscle weakness	LL	WC	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	WC	RPMW
Respiratory distress	VS	VS	No	No	No	No	O	O and FE	VS/night	VS	VS
Cardiomyopathy	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	Yes
Hepatomegaly	Yes	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No
Underweight	Yes	No	No	No	No	No	No	No	No	No	Yes
Associated	FD	SDB	No	No	No	No	No	No	SDB	FD	FD
CK (IU/L)	127	545	332	No data	No data	No data	488	912	977	736	350
AST/ALT (IU/L)	142/144	187/112	66/70	No data	No data	No data	56/46	46/44	125/118	213/154	226/180
<i>GAA mutations</i>											
	c.1064T>C (p.Leu355 Pro)	c.1064T>C (p.Leu355 Pro)	c.-32-13T>G	c.2481+102_2646del (p.Gly828 Asn882del)	Idem Pt4	Idem Pt4	c.2560 C>T (p.Arg854X)	c.-32-13T>G	c.2560 C>T (p.Arg854X)	c.2560 C>T (p.Arg854X)	c.2560C>T (p.Arg854X)
	c.1106T>C (p.Leu369 Pro)*		c.525delT (p.Glu176 fsx45)	c.-32-2A>G	Idem Pt4	Idem Pt4	c.1581 A>G (p.Arg527Arg)	c.1551 +42A>G	c.1551 +42A>G	c.1551 +42A>G	c.2236 T>C (p.Trp746 Arg)*
							c.-32-13T>G		c.1581A >G (p.Arg527Arg)	c.1551 +42A>G	c.596G >A (p.Arg199His)
							c.596G >A (p.Arg199His)		c.596G >A (p.Arg199His)	c.596G >A (p.Arg199His)	c.68A >G (p.His223Arg)
							c.668A >G (p.His223Arg)		c.668A >G (p.His223Arg)	c.668A >G (p.His223Arg)	c.2553A >G (p.Gly851 Gly)

Table 1 (continued)

	Patient 1	Patient 2	Patient 3	Patient 4	Patient 5	Patient 6	Patient 7	Patient 8	Patient 9	Patient 10	Patient 11
<i>Laboratory findings</i>							c.1551 +49A>C		c.2338A >G (p.Ile780 Val)	c.2338A >G (p.Ile780 Val)	c.1551+49A>C
CK (IU/L)	127	545	332	No data	No data	No data	488	912	977	736	350
AST/ALT (IU/L)	142/144	187/112	66/70	No data	No data	No data	56/46	46/44	125/118	213/154	226/180

PI Pulmonary, *LW* Limb-girdle weakness, *HDMD* Hypotonia/delayed motor development, *LL* Lower limbs, *WC* Wheelchair, *O* Orthopnea, *FE* Fatigue on exertion, *FD* Feeding difficulties, *SDB* Sleep-disordered breathing, *RPMW* Rapidly progressive muscle weakness.

Underlined mutations denote homozygous status; mutations in bold are pathogenic; *denotes novel mutations.

was purified by using shrimp alkaline phosphatase and exonuclease I. PCR primers were used to sequence the coding regions in both sense and antisense directions using an ABI 3730xl sequencer (Ko et al. 1999). The presence of each non-synonymous variant was confirmed by an additional round of PCR and sequencing. Variations at the DNA level were identified using human *GAA* wild-type mRNA sequence (NM_000152.3). Sequence variations were described according to the international mutation nomenclature guidelines as set forth by the Human Genome Variation Society (<http://www.hgvs.org/mutnomen/>). Intron mutations were designated by locating its cDNA position and, as described by den Dunnen et al. (den Dunnen and Antonarakis 2000), negative numbers were reported from the starting of the splice acceptor site. *GAA* mutant protein sequences were aligned and compared with the human wild-type version (NP_000143.2) using ClustalW software. In order to assess conservation during evolution of residues at mutated sites, this program was also used to perform multiple alignments of protein sequences from vertebrate species: *Homo sapiens*, *Pongo abeili*, *Bos taurus*, *Mus musculus*, and *Rattus norvegicus*. Data from the Pompe disease mutation database (www.pompecenter.nl) were used to define novel *GAA* sequence variants as well as to identify which of them were previously related to pathogenic effects. To predict the effect of newly identified missense mutations we also used SIFT and PolyPhen2 software. PolyPhen2 prediction values are the result of an algorithm, which considers distinct features such as comparative analysis of protein sequences from different species, physicochemical characteristics of the exchanged amino acids and mapping of residues replacement to available 3D structures. Results are assessed as a quantitative value (a probability of being deleterious) and as a qualitative feature (benign, possibly damaging, or probably damaging). SIFT program predicts the potential pathogenic effects of amino acid substitutions on the basis of sequence homology and physical properties of the exchanged residues. Scores lower than 0.05 predict a potential deleterious effect.

Functional Analysis of *GAA* Mutations

An expression vector (pSHAG2), containing the wild-type *GAA* open reading frame (named *GAA*-Wild-Type), was used to perform site-directed mutagenesis. We introduced into this plasmid the two novel *GAA* c.1106 T > C (p.Leu369Pro) or c.2236 T > C (p.Trp746Arg) missense mutations found in Colombian patients. These constructs were named *GAA*-Leu369Pro and *GAA*-Trp746Arg, respectively. Similarly, we created four additional constructs (*GAA*-Trp746X, *GAA*-Trp746Cys, *GAA*-Trp746Gly and *GAA*-Trp746Ser) carrying mutant *GAA* versions, which represent previously reported mutations

located at position 746. The integrity of the resulting mutant constructs was, in each case, confirmed by direct sequencing.

HEK 293 T cells were seeded into 24-well plates and grown overnight in DMEM medium supplemented with 10% of fetal bovine serum, 50U/mL of penicillin and 50 µg/mL of streptomycin, in a 10% carbon dioxide and 90% air humidified incubator. Cells at 80–90% of confluence were transfected with 1.4 µg of *GAA*-WT or mutant constructs using polyethyleneimine. Mock transfected cells served as negative controls. Seventy-two hours after transfection, cells were washed with PBS and harvested with lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.0, 150 mM NaCl, 50 mM NaF, and 1% TritonX-100). After centrifugation (10,000 g for 10 min), the supernatant fraction was recovered. *GAA* activity was measured in both medium and cell homogenates (Müller-Felber et al. 2007). As described by Kroos et al. (2008), the mutation severity scoring system is based on the assessment of *GAA* activity levels in the medium and in the cells, and on the quality and quantity of the different molecular species that arise during *GAA* posttranslational modification (Kroos et al. 2008). To visualize protein biosynthesis and post-translational processing, cell homogenates and immunoprecipitated *GAA* from the medium were subjected to SDS-PAGE followed by Western-blotting (Müller-Felber et al. 2007). To visualize *GAA* on the blots we used *GAA*-specific polyclonal mouse and rabbit antisera as primary antibodies and goat anti-mouse IRDye 800LT (LI-COR Biosciences) and goat anti-rabbit IRDye 700LT (LI-COR Biosciences) as secondary antibodies. Transfection assays and *GAA* measurements were performed three times as duplicates.

Results

GAA Mutation Detection and In Silico Analysis

Sequence analysis of the complete coding region of *GAA*, performed in 11 Colombian PD patients, revealed six sequence variants previously related with PD pathogenesis: c.-32-13 T > G, c.-32-2A > G, c.525delT (p.Glu176fsX45), c.1064 T > C (p.Leu355Pro), c.2481 + 102_2646del (p.Gly828_Asn882del), and c.2560 C > T (p.Arg854X) (Table 1). Pt 2 was homozygous for the p.Leu355Pro mutation and pt 3 showed compound heterozygosity for the two pathogenic variants c.-32-13 T > G and c.525delT (p.Glu176fsX45). Three related patients (pt 4, 5, and 6) shared the c.-32-2A > G/c.2481 + 102_2646del (p.Gly828_Asn882del) compound heterozygous genotype. Pt 7 was compound heterozygote for the sequence variants c.2560 C > T (p.Arg854X) and

c.-32-13 T > G. Pt 8 displayed c.-32-13 T > G homozygosity. Patients 9 and 10 were also related. They shared the c.2560 C > T (p.Arg854X) heterozygous mutation. Pt 7, 9, and 10 also carried non-synonymous and intronic variants, which were previously described in PD patients but were not related with the disease pathogenesis (Table 1).

Pt 1 and 11 displayed novel c.1106 T > C (p.Leu369Pro) and c.2236 T > C (p.Trp746Arg) heterozygous variants, respectively. These mutations are located in the catalytic (β/α)₈ barrel (p.Leu369Pro) and in the proximal C-terminal (p.Trp746Arg) domains of GAA. Both these patients are compound heterozygous for deleterious *GAA* mutations since they also presented c.1064 T > C (p.Leu355Pro) (pt 1) and c.2560 C > T (p.Arg854X) (pt 11).

At the protein level, comparative in silico analysis of the novel p.Leu369Pro and p.Trp746Arg mutations showed a strict conservation among vertebrate species of both Leucine and Tryptophan residues at positions 369 and 746, respectively (Fig. 1). Polyphen bioinformatic tool predicted that these mutations are probably damaging. Similarly, SIFT software showed probabilistic scores compatible with a potential deleterious effect (p.Leu369Pro = 0.00, p.Trp746Arg = 0.01).

Functional Characterization of *GAA* Mutations

To further investigate the effect of p.Leu369Pro and p.Trp746Arg, both these mutations were introduced in the wild-type *GAA* cDNA by site directed mutagenesis and transiently expressed in HEK-293 cells. Cells and media were analyzed for GAA content by polyacrylamide gel electrophoresis followed by western blotting. The results are shown in Fig. 2a (cells) and 2b (media). Mock transfected HEK-293 cells showed faint signals in cells and culture medium (Fig. 2a–b). Since HEK-293 cells constitutively express human GAA, these signals can be considered as background staining.

Cells transfected with the *GAA* wild-type construct contained three molecular species representing the 110 kD precursor, the 95 kD partially processed intermediate and the 76 kD mature form of GAA. The medium contained only the 110 kD GAA precursor (Fig. 2). Similar results in cells and media were obtained after transfection of HEK-293 cells with the mutated p.Trp746Cys and p.Trp746Ser constructs. Quite different results were obtained after transfection with p.Trp746Arg, p.Trp746Gly, and p.Leu369P: only the intracellular 110 kD GAA precursor and no other forms of GAA were detected in cells or media, except for possibly a little bit of 76 kD mature enzyme after transfection with p.Trp746Arg. Transfection with p.Trp746X resulted in the formation of a unique molecular species with an apparent molecular mass between 76 and 95 kD in the cells. In all cases we also measured the GAA

activity in cells and media and used the scoring system as described by Kroos et al. (2008) to evaluate the severity of all the different mutations. The results are summarized in Table 2.

Discussion

In an effort to delineate the clinical and molecular features of Colombian PD patients, we identified 11 cases in which we performed *GAA* genotype analysis. Among the six different mutations that we identified in this study and that were previously related to PD pathogenesis, two affect the *GAA* mRNA splicing (c.-32-13 T > G and c.-32-2A > G), one is a missense mutation (c.1064 T > C/p.Leu355Pro), one is a single base pair deletion (c.525delT/p.Glu176fsX45), one is a large deletion including exon 18 (c.2481 + 102_2646del/p.gly828_Asn882del), and one is a nonsense mutation (c.2560 C > T/p.Arg854X).

GAA c.-32-13 T > G was most frequently encountered since three patients (pt 3, 7, and 8) (allelic frequency = 0.27) were found to be either homozygous or heterozygous for this mutation. This sequence variation is the most common pathogenic *GAA* mutation among Caucasian individuals (>70%) affected by slowly progressive PD (Hirschhorn et al. 2001; Ko et al. 1999). Pt 3 and 7, respectively, presented p.Glu179fsX45 and p.Arg854X as second pathogenic mutation. In both patients, limb girdle weakness and orthopnea were recorded as the first PD symptoms, but the age of onset differed substantially (12 vs 27 years). These findings fit with the notion that the clinical picture of patients carrying the c.-32-13 T > G mutation can vary in terms of the age of onset and rate of disease progression due to modifying factors (Huie et al. 1994; Kroos et al. 2007). Pt 8, who displayed c.-32-13 T > G homozygosity, showed first symptoms at the age of 38 years and had mild clinical features. Homozygosity for the c.-32-13 T > G variant is particularly rare as only three cases have been reported so far (Müller-Felber et al. 2007; Laforêt et al. 2000; Labrousse et al. 2010). Similarly to the patient reported by Laforêt et al., this individual was classified as a late-onset case since the first symptoms manifested after the age of 38 years. It has been proposed that the rare finding of affected c.-32-13 T > G homozygotes is probably related to the high level of residual GAA activity that is associated with this genotype. Notably, all our patients having the c.-32-13 T > G mutation shared six additional sequence variants (SNP-IDs: rs17410539, rs11150843, rs7225049, rs3176968, rs1042397, rs1042397), which together mark the most common c.-32-13 T > G haplotype encountered among Caucasian PD patients (Müller-Felber et al. 2007; Kroos et al. 2008).

1A	
<i>H. sapiens</i>	PFMPPYWGLGFHLCRWGYSSTAIRQWEN
<i>P. abelii</i>	PFMPPYWGLGFHLCRWGYSSTAIRQWEN
<i>B. taurus</i>	PFMPPYWGLGFHLCRWGYSSTAIRQWEN
<i>M. musculus</i>	PFMPPYWGLGFHLCRWGYSSTAIRQWEN
<i>R. norvegicus</i>	PFMPPYWGLGFHLCRWGYSSTAIRQWEN
	369 746
1B	
<i>H. sapiens</i>	FPKDSSTWTVDHQLLWGEALLITPVLAQAK
<i>P. abelii</i>	FPKDSSTWTVDHQLLWGEALLITPVLAQAK
<i>B. taurus</i>	FPEDPSTWTVDRQLLWGEALLITPVLEAEK
<i>M. musculus</i>	FPEDPSTWSVDRQLLWGPALLITPVLEPGK
<i>R. norvegicus</i>	FPEDPSTWSVDRQLLWGPALLITPVLEPGK

Fig. 1 Alignment of the *GAA* sequences of selected vertebrates: for leucine at position L369 (1A) and for tryptophane at position W746 (1B)

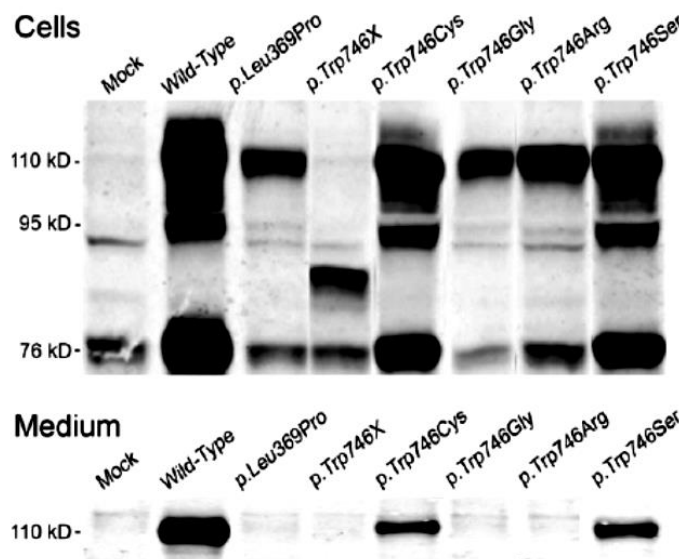


Fig. 2 Western blot analysis of *GAA* expression in transiently transfected HEK293 cells. Cells and culture media were harvested 72 h after transfection and the different molecular species representing precursor *GAA* (110 kD), partially processed precursor (95 kD) and

mature *GAA* (76 kD) were separated by SDS-PAGE and visualized by immunoblotting as described in Materials and Methods. Panel A, cell homogenates; Panel B, media

Pt 2, who was diagnosed at the age of 11 years and homozygous for c.1064 T > C (p.Leu355Pro), confirms the previously established genotype-phenotype correlation for this mutation in that it is associated with an early childhood presentation of PD (Labrousse et al. 2010; Montalvo et al. 2004). Pt 4, 5, and 6, who are related and were diagnosed at ages of 33, 35, and 36 years, appeared to have the c.-32-2A > G/c.2481 + 102_2646del (p. Gly828_Asn882del) genotype. Interestingly, c.-32-2A > G was previously reported to be associated with early-onset

PD (Kroos et al. 2008). Thus, our results do not correlate with those previously reported and argue in favor of a relatively mild effect of the c.-32-2A > G mutation or the impact of modifying factors.

The p.Arg854X mutation, which has been reported as the most frequent *GAA* sequence variation among Afro-American PD patients, was identified in four of our Colombian patients (pt 7, 9, 10, and 11) at heterozygous state (Raben et al. 1999). Homozygotes for this mutation have infantile onset PD (Laforêt et al. 2000; Kroos et al.

Table 2 *GAA* sequence variations analyzed by transient expression in HEK293 cells

Nucleotide change	Amino acid change	M 110*	C110*	C95*	C76*	M%	C%	Class*
c.1106 T > C	p.Leu369Pro	1,1	3,4	2,4	?	0.2	3.1	B
c.2238 G > A	p.Trp746X	1,1	3,2	1,1	?	-0.2	-0.14	A
c.2238 G > C	p.Trp746Cys	3,4	3,4	3,4	3,4	5.4	29.4	D
c.2236 T > G	p.Trp746Gly	1,1	3,4	2,4	?	0.2	2.1	B
c.2236 T > C	p.Trp746Arg	1,1	3,4	2,4	?	-0.1	3.5	B
c.2237 G > C	p.Trp746Ser	3,4	4, 4	3,4	3,4	8.2	40.1	E

The two new missense mutations that we analyzed in this study are shown in bold

*M110, C10, C95, and C76 stand for the various molecular forms of GAA that arise during synthesis and posttranslational modification and that can be visualized by western blotting as illustrated in Fig 2a and b. The numbers refer to the severity rating system as published by Kroos et al. (2008). Class A mutations are very severe, class B mutations are potentially less severe, class D mutations are mild, and class E mutations are probably nonpathogenic

The question mark (?) signifies that there remains uncertainty about the formation of the 76 kD form of GAA (in column 1)

2008; Reuser et al. 1989). The patients in our study lacked cardiomyopathy and presented their first clinical signs after 10 years of age. The difference in age of onset must be due to residual GAA activity conferred by a less severe mutation located on the second allele. Indeed, pt 7 carried the c.-32-13 T > G mutation, which displays significant residual activity that apparently compensates the strong deleterious effect of the Arg854X mutation. Unfortunately, we failed to establish a more precise genotype-phenotype correlation in pt 9 and 10 (who are related) since we did not find the second *GAA* mutation.

Pt 11 with infantile PD had the first clinical signs (hypotonia, delayed motor development) at 3 months of age. Apart from the p.Arg854X amino acid change, this patient displayed the novel p.Trp746Arg mutation, which is located in the proximal C-terminal domain of GAA. Comparative sequence analysis of vertebrate species demonstrated a strict conservation of this tryptophane suggesting its essential functional role. The substitution Trp to Arg implicates a drastic modification in terms of physicochemical properties. Indeed, tryptophane is a nonpolar aromatic amino acid whereas Arg is a small polar hydrophilic residue. These features were reinforced by SIFT and Polyphen2 bioinformatic tools which predicted a potential deleterious effect of the p.Trp746Arg mutation.

In accordance with these predictions, transient expression studies demonstrated that the structural changes conferred by p.Trp746Arg do not inhibit the synthesis of the 110 kD precursor but affect the processing and intracellular transport of GAA (Fig. 2). According to the mutation severity scoring system proposed by Kroos et al. (2008) these results argue in favor of a potentially less severe mutation. Additional analysis of previously described variants revealed similar results for the substitu-

tion p.Trp746Gly, which was found during a newborn screening program in a patient with low GAA activity (Labrousse et al. 2010). The p.Trp746Cys and p.Trp746Ser variants can both be classified as relatively mild mutations since the 110 kD GAA precursor as well as processed forms of GAA were detected in both cases, albeit in less than normal amount (Fig. 2a–b, Table 2). Notably, up till now some controversy existed concerning the pathogenicity of p.Trp746Cys since it was described as a polymorphism as well as a causal mutation (Wan et al. 2008; Chien et al. 2011). Our results argue in favor of a mildly deleterious effect.

Transient expression of the p.Trp746X mutation resulted in the appearance of a truncated precursor, which is apparently stable enough to be visualized by western blotting, but lacks catalytic activity. This situation corroborates previous clinical findings in which patients carrying this mutation are affected by infantile PD (Kishnani et al. 2006; Beesley et al. 1998).

Next to p.Trp746Arg, p.Leu369Pro was the second novel mutation identified in our study. It was found in an affected child in combination with p.Leu355Pro. Pulmonary distress was diagnosed at 1 year of age, and the patient required ventilation support at the age of 9 years. The muscle weakness was especially severe. In silico analysis of this mutation suggested a pathogenic effect, similar to p.Trp746Arg, based on the strict conservation of the Leu residue at position 369 among vertebrate species. This prediction was validated by transient expression studies since the amino acid substitution appeared to hamper the posttranslational modification and intracellular transport of GAA (Fig. 2a–b, Table 2).

Finally, from an ethnical point of view, it is interesting that the two most common *GAA* mutations found in our study are also common in Caucasian (c.-32-13 T > G) and

African (p.Arg854X; allele frequency = 0.43) populations (Becker et al. 1998). Notably, all Colombian patients presenting p.Arg854X shared a previously identified haplotype found in black PD patients from the United States, the Ivory Coast, Ghana, and Namibia (Becker et al. 1998; Hermans et al. 1993). These findings evoke a remarkable Afro-American and European ancestry of the Colombian population.

In summary, we investigated the genetics of PD in the Colombian population and identified two novel causative mutations in the GAA gene in addition to other previously reported pathogenic sequence variations. Valuable information on the genotype-phenotype correlation was obtained that is expected to facilitate and improve genetic counseling of affected individuals and their families.

Acknowledgments This work was supported by the Universidad del Rosario (Grant CS/Genetics) and by Genzyme Corporation, Colombia.

References

- Becker JA et al (Apr 1998) The African origin of the common mutation in African American patients with glycogen-storage disease type II. *Am J Hum Genet* 62(4): 991–994. ISSN 0002-9297. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9529346>
- Beesley CE, Child AH, Yacoub MH (1998) The identification of five novel mutations in the lysosomal acid α -(1-4) glucosidase gene from patients with glycogen storage disease type II. Mutations in brief no. 134. *Hum Mutat* 11(5): 413. ISSN 1059-7794. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10206684>
- Boerkoel CF et al (Apr 1995) Leaky splicing mutation in the acid maltase gene is associated with delayed onset of glycogenosis type II. *Am J Hum Genet* 56(4): 887–897. ISSN 0002-9297. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7717400>
- Chien YH et al (Jun 2011) Later-onset Pompe disease: early detection and early treatment initiation enabled by newborn screening. *J Pediatr* 158(6): 1023–1027.e1. ISSN 1097-6833. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21232767>
- Den Dunnen JT, Antonarakis SE (2000) Mutation nomenclature extensions and suggestions to describe complex mutations: a discussion. *Hum Mutat* 15(1): 7–12. ISSN 1059-7794. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10612815>
- Hermans MM et al (1993) Two mutations affecting the transport and maturation of lysosomal α -glucosidase in an adult case of glycogen storage disease type II. *Hum Mutat* 2(4): 268–273. ISSN 1059-7794. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8401535>
- Hirschhorn R, Reuser A (2001) Glycogen storage disease type II (GSDII). In: Scriver C, Beaudet A, Sly W, Valle D (eds) *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. McGraw-Hill, New York, pp 3389–3420
- Huie ML et al (Dec 1994) Aberrant splicing in adult onset glycogen storage disease type II (GSDII): molecular identification of an IVS1 (-13 T- > G) mutation in a majority of patients and a novel IVS10 (+1GT- > CT) mutation. *Hum Mol Genet* 3(12): 2231–2236. ISSN 0964-6906. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7881425>
- Kishnani PS et al (May 2006) A retrospective, multinational, multicenter study on the natural history of infantile-onset Pompe disease. *J Pediatr* 148(5): 671–676. ISSN 0022-3476. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16737883>
- Ko TM et al (1999) Molecular genetic study of Pompe disease in Chinese patients in Taiwan. *Hum Mutat* 13(5): 380–384. ISSN 1059-7794. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10338092>
- Kroos MA et al (Jan 2007) Broad spectrum of Pompe disease in patients with the same c.-32-13 T- > G haplotype. *Neurology* 68(2): 110–115. ISSN 1526-632X. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17210890>
- Kroos M et al (Jun 2008) Update of the Pompe disease mutation database with 107 sequence variants and a format for severity rating. *Hum Mutat* 29(6): E13–26. ISSN 1098-1004. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18425781>
- Labrousse P et al (Apr 2010) Genetic heterozygosity and pseudodeficiency in the Pompe disease newborn screening pilot program. *Mol Genet Metab* 99(4): 379–383. ISSN 1096-7206. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20080426>
- Laforêt P et al (Oct 2000) Juvenile and adult-onset acid maltase deficiency in France: genotype-phenotype correlation. *Neurology* 55(8): 1122–1128. ISSN 0028-3878. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11071489>
- Li Y et al (Oct 2004) Direct multiplex assay of lysosomal enzymes in dried blood spots for newborn screening. *Clin Chem* 50(10): 1785–1796. ISSN 0009-9147. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15292070>
- Montalvo AL et al (Mar 2004) Glycogenosis type II: identification and expression of three novel mutations in the acid α -glucosidase gene causing the infantile form of the disease. *Mol Genet Metab* 81(3): 203–208. ISSN 1096-7192. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14972326>
- Müller-Felber W et al (Oct 2007) Late onset Pompe disease: clinical and neurophysiological spectrum of 38 patients including long-term follow-up in 18 patients. *Neuromuscul Disord* 17(9–10): 698–706. ISSN 0960-8966. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17643989>
- Oba-Shinjo SM et al (Nov 2009) Pompe disease in a Brazilian series: clinical and molecular analyses with identification of nine new mutations. *J Neurol* 256(11): 1881–1890. ISSN 1432-1459. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19588081>
- Palmer RE et al (Jan 2007) Pompe disease (glycogen storage disease type II) in Argentinians: clinical manifestations and identification of 9 novel mutations. *Neuromuscul Disord* 17(1): 16–22. ISSN 0960-8966. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17056254>
- Pittis MG et al (Jun 2008) Molecular and functional characterization of eight novel GAA mutations in Italian infants with Pompe disease. *Hum Mutat* 29(6): E27–36. ISSN 1098-1004. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18429042>
- Raben N et al (1999) Novel mutations in African American patients with glycogen storage disease Type II. Mutations in brief no. 209. *Hum Mutat* 13(1): 83–84. ISSN 1059-7794. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10189220>
- Raben N et al (Nov–Dec 2007) Deconstructing Pompe disease by analyzing single muscle fibers: to see a world in a grain of sand... *Autophagy* 3(6):546–552. ISSN 1554-8627. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17592248>
- Reuser AJ et al (Jun 1987) Clinical diversity in glycogenosis type II. Biosynthesis and in situ localization of acid α -glucosidase in mutant fibroblasts. *J Clin Invest* 79(6): 1689–1699. ISSN 0021-9738. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3108320>
- Sharma MC et al (2005) Delayed or late-onset type II glycogenosis with globular inclusions. *Acta Neuropathol* 110(2): 151–157. ISSN 0001-6322. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15986226>
- Slonim AE et al (Jan 2007) Modification of the natural history of adult-onset acid maltase deficiency by nutrition and exercise therapy. *Muscle Nerve* 35(1): 70–77. ISSN 0148-639X. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17022069>
- Sugawara K et al (Jun 2009) Structural modeling of mutant α -glucosidases resulting in a processing/transport defect in Pompe disease. *J Hum Genet* 54(6): 324–330. ISSN 1435-232X. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19343043>

- van den Hout HM et al (Aug 2003) The natural course of infantile Pompe's disease: 20 original cases compared with 133 cases from the literature. *Pediatrics* 112(2): 332–340. ISSN 1098-4275. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12897283>
- van der Ploeg AT, Reuser AJ (Oct 2008) Pompe's disease. *Lancet* 372(9646): 1342–1353. ISSN 1474-547X. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18929906>
- van der Ploeg A et al (2010) A randomized study of alglucosidase alfa in late-onset Pompe's disease. *N Engl J Med* 362(15):1396–1406. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20393176>
- Wan L et al (Jun 2008) Identification of eight novel mutations of the acid alpha-glucosidase gene causing the infantile or juvenile form of glycogen storage disease type II. *J Neurol* 255(6): 831–838. ISSN 0340-5354. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18458862>