



**Universidad**  
Zaragoza

## **Trabajo Fin de Máster**

# **ESTUDIO DE ENFERMEDAD DE FABRY EN PACIENTES CON MIOCARDIOPATÍA HIPERTRÓFICA DE VENTRÍCULO IZQUIERDO**

**JORGE JAVIER CEBOLLA SANZ**

Dr. Miguel Pocoví Mieras

Dra. Pilar Giraldo Castellano

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA, BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR  
(FACULTAD DE CIENCIAS)

2013

# ÍNDICE

# ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>11</b>
1.1. Antecedentes históricos .....	11
1.2. Epidemiología .....	12
1.3. Genética molecular en la EF .....	12
1.3.1. Mutaciones en el gen <i>GLA</i> .....	13
1.3.2. Correlación genotipo – fenotipo .....	14
1.3.3. La EF en las mujeres. Bases Genéticas y moleculares .....	14
1.3.4. Estructura enzimática .....	16
1.3.5. Fisiopatología de la EF .....	16
1.4. Características clínicas .....	17
1.4.1. Síntomas tempranos .....	17
1.4.2. Afectación renal .....	18
1.4.3. Afectación cerebrovascular .....	18
1.4.4. Afectación cardíaca .....	19
1.5. Diagnóstico .....	19
1.5.1. Diagnóstico enzimático .....	19
1.5.2. Diagnóstico genético .....	20
1.5.3. Detección de productos de acúmulo .....	20
1.5.4. Marcadores biológicos .....	20
1.6. Tratamiento .....	21
1.6.1. Tratamiento enzimático sustitutivo (TES) .....	21
1.6.2. Tratamiento por reducción de sustrato .....	22
1.6.3. Tratamiento con chaperonas moleculares .....	22
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>24</b>
<b>3. MATERIALES Y METODOLOGÍA</b> .....	<b>27</b>
3.1. Paciente y controles .....	29
3.2. Estudio ecocardiográfico .....	29
3.3. Extracción de sangre periférica .....	29
3.3.1. Cribado enzimático y genético en DBS sobre tarjeta con filtro tipo FTA .....	29

3.3.2. Estudios complementarios .....	30
3.4. Obtención de un concentrado de leucocitos a partir de sangre periférica	31
3.5. Aislamiento de DNA genómico .....	32
3.5.1. Procedente de muestra DBS sobre tarjeta tipo FTA .....	32
3.5.2. Procedente de muestra de sangre periférica .....	33
3.6. Aislamiento de RNA total .....	33
3.7. Análisis de concentración, pureza y purificación de ácidos nucleicos ....	34
3.7.1. Concentración y pureza del DNA genómico.....	34
3.7.2. Concentración y pureza del RNA total .....	34
3.7.3. Purificación del DNA genómico o del RNA total.....	35
3.7.4. Determinación de la integridad del RNA .....	35
3.8. Determinación de la actividad enzimática.....	36
3.8.1. En muestras de DBS sobre tarjeta tipo FTA .....	36
3.8.2. En muestras de Plasma .....	37
3.8.3. EN concentrado de Leucocitos.....	38
3.9. Análisis molecular del gen <i>GLA</i> .....	40
3.9.1. Diseño, optimización y amplificación de fragmentos gen <i>GLA</i> .....	40
3.9.2. Purificación de Producto de PCR .....	42
3.9.3. Reacción de secuenciación de Sanger combinada con electroforesis capilar. Análisis de secuencias.....	43
3.9.4. Análisis de restricción. Identificación de variantes en el gen <i>GLA</i> ....	45
3.10. Análisis “in silico” de las variantes en zona promotora .....	46
3.11. Análisis de variantes de ajuste “splicing” alternativo .....	46
3.11.1. Análisis “in silico de las variantes de ajuste alternativo.....	47
3.11.2. Síntesis de cDNA total.....	47
3.11.3. Control de calidad de RT-PCR.....	48
3.11.4. Amplificación de cDNA específico de gen <i>GLA</i> .....	49
3.11.5. Caracterización electroforética de fragmentos de cDNA específico de gen <i>GLA</i> en geles de poliacrilamida .....	20
3.12. Análisis estadístico .....	51
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>54</b>
4.1. Características de la muestra de estudio.....	54
4.2. Valoración del estudio ecocardiográfico .....	56

4.3. Cribado enzimático en DBS sobre tarjeta FTA .....	57
4.4. Análisis genético y descripción de variantes nucleotídicas identificadas .	61
4.4.1.Descripción de variantes nucleotídicas identificadas .....	63
4.4.2.Análisis de asociación en las variantes identificadas y la EF .....	63
4.5. Caracterización de las nuevas variantes nucleotídica .....	68
4.5.1.Búsqueda de sitios de unión de factores de transcripción a la zona promotora circundante a la variante c.-34 c>t.....	68
4.5.2.Análisis enzimático de las variantes c.-34 c>t y c.192 C>T (p.l64=) .	69
4.5.3.Caracterización mediante separación de fragmentos por electroforesis en geles de PAA al 6% de la variante c.192 C>T (p.l64=).....	69
4.6. Haplotipos Complejos Intrónicos (HCI) identificados y combinaciones de éstos. Descripción y estudios complementarios.....	70
4.6.1.Análisis enzimático .....	72
4.6.2.Caracterización mediante separación de fragmentos por electroforesis en geles de PAA al 6% .....	74
<b>5. CONCLUSIONES .....</b>	<b>78</b>
<b>6. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>80</b>

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1.1.: Defecto enzimático de la EF. ....	11
Figura 1.2.: Estructura del gen <i>GLA</i> . ....	12
Figura 1.3.: Expresión fenotípica del mosaicismo germinal del locus O-o en la capa de gatas carey. ....	15
Figura 1.4.: Estructura tridimensional de la enzima $\alpha$ -Gal A. ....	16
Figura 1.5.: Angiokeratoma y “Cornea Verticillata”. ....	18
Figura 3.1.: Modelo de tarjeta tipo FTA para recogida y envío de muestras. ....	30
Figura 3.2.: Proceso de sonicado de leucocitos. ....	39
Figura 4.1.: Distribución de Tipos de MHVI según sexos. ....	57
Figura 4.2.: Electroforesis en gel al 3% de agarosa de alta resolución para identificación de variantes en el gen <i>GLA</i> mediante RFLP'S. ....	62
Figura 4.3.: Caracterización electroforética en gel de PAA al 6% del cDNA de <i>GLA</i> de la variante c.192 C>T (p.I64=). ....	70
Figura 4.4.: Distribución de HCl y sus combinaciones según sexos. ....	72
Figura 4.5. Distribución de HCl y sus combinaciones según tipo de MHVI ....	72
Figura 4.6.: Caracterización electroforética en gel de PAA al 6% del cDNA de <i>GLA</i> en pacientes con HCl y combinaciones de éstas. ....	75

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 3.1.: Cebadores específicos para la amplificación de regiones de interés del gen <i>GLA</i> . .....	11
Tabla 3.2.: Estequiometría para la amplificación por PCR de los diferentes amplicones del gen <i>GLA</i> . .....	41
Tabla 3.3.: Programas térmicos para amplificar por PCR los diferentes amplicones del gen <i>GLA</i> . .....	42
Tabla 3.4.: Estequiometría para la purificación del producto de PCR de los amplicones del gen <i>GLA</i> . .....	43
Tabla 3.5.: Estequiometría para la purificación del producto de secuenciación. .	44
Tabla 3.6.: Cebadores específicos para la amplificación de un fragmento del cDNA correspondiente al mRNA del gen <i>ACTB</i> . .....	48
Tabla 3.7.: Estequiometría para la amplificación por PCR de un fragmento del cDNA correspondiente al mRNA del gen <i>ACTB</i> . .....	49
Tabla 3.8.: Cebadores específico para la amplificación del cDNA correspondiente al mRNA del gen <i>GLA</i> . .....	49
Tabla 3.9.: Estequiometría para la amplificación por PCR del cDNA correspondiente al mRNA del gen <i>GLA</i> . .....	50
Tabla 3.10.: Reactivos para polimerización de PAA al 6%. .....	51
Tabla 4.1.: Características de los pacientes con MHVI distribuidos por centros participantes. ....	54-55
Tabla 4.2.: Descripción de los tipos de MHVI según sexos. ....	56
Tabla 4.3.: Valores de actividad enzimática de muestras DBS en tarjeta tipo FTA de pacientes. ....	58
Tabla 4.4.: Resultados del cribado enzimático de muestra de DBS en tarjeta tipo FTA, según sexos.....	59
Tabla 4.5.: Variantes nucleotídicas encontradas por resecuenciación del gen <i>GLA</i> . .....	61
Tabla 4.6.: Análisis de asociación genotípica y alélica en mujeres con MHVI y la EF.....	66
Tabla 4.7.: Análisis de asociación genotípica y alélica en varones con MHVI y la EF.....	67

Tabla 4.8.: Factores de transcripción que potencialmente se unen a la secuencia consenso circundante a la variante c.-34 c>t. ....	68
Tabla 4.9.: Haplotipos Complejos Intrónicos (HCI) de nuestra muestra. ....	71
Tabla 4.10.: Distribución de HCI y combinaciones de éstos en nuestra muestra. ....	71
Tabla 4.11.: Actividades enzimáticas en plasma y extracto celular de leucocitos de individuos control.....	73
Tabla 4.12.: Actividades enzimáticas en plasma y extracto celular de leucocitos de pacientes con HCI Tipo I, Tipo III y las combinaciones de éstos. ....	74

## ENLACES

dbSNP	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/</a>
ESP-NHLBI	<a href="http://evs.gs.washington.edu/EVS/">http://evs.gs.washington.edu/EVS/</a>
Fabry Registry <sup>®</sup>	<a href="https://www.lsdregistry.net/fabryregistry/">https://www.lsdregistry.net/fabryregistry/</a>
Fabry Outcome Survey <sup>®</sup>	<a href="http://www.globaloutcomesurveys.com/">http://www.globaloutcomesurveys.com/</a>
Gene	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/</a>
Gene Bank (NCBI/ NIH/NLM)	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/</a>
HGMD	<a href="http://www.hgmd.cf.ac.uk/">http://www.hgmd.cf.ac.uk/</a>
MatInspector	<a href="http://www.genomatix.de/">http://www.genomatix.de/</a>
Mutationtaster	<a href="http://www.mutationtaster.org/">http://www.mutationtaster.org/</a>
PDB	<a href="http://www.rcsb.org/pdb/">http://www.rcsb.org/pdb/</a>
OMIM	<a href="http://www.omim.org/">http://www.omim.org/</a>
Proyecto 1000 Genomas	<a href="http://www.1000genomes.org/">http://www.1000genomes.org/</a>
RestrictionMapper	<a href="http://www.restrictionmapper.org/">http://www.restrictionmapper.org/</a>
SSPNN	<a href="http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html">http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html</a>

## ABREVIATURAS

Ø	Diámetro
λ	Longitud de onda
α-Gal A	α-Galactosidasa A
α-Gal B	α-Galactosidasa B o α-N-Acetilgalactosaminidasa
3'-UTR	Región 3' no transcrita
A	Amperio
APS	Persulfato amónico
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
c.s.p.	Cantidad suficiente para
ddH <sub>2</sub> O	Agua ultrapura libre de DNAsas/RNAsas
DBS	“Dried Blood Spot”
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxinucleótido trifosfato
ddNTPs	Dideoxinucleótidos trifosfato
EF	Enfermedad de Anderson-Fabry o de Fabry
EDTA	Ácido etilendianimotetraacético
EMSA	“Electrophoretic Mobility Shift Assay”
ESP	Proyecto de secuenciación de exomas
FTA	Tarjeta con papel de filtro para conservar muestras biológicas
Gb3	Globotriaosilceramida
Gb2	Lactosilceramida
Gb4	Globotetraosilceramida
Hg	Mercurio
HCI	Haplotipo complejo intrónico
HVI	Hipertrofia ventricular izquierda
HTA	Hipertensión arterial
IMC	Índice de masa corporal
K <sub>2</sub> EDTA	Sal dipotásica del ácido etilendianimotetraacético
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
MHVI	Miocardiopatía hipertrófica de ventrículo izquierdo

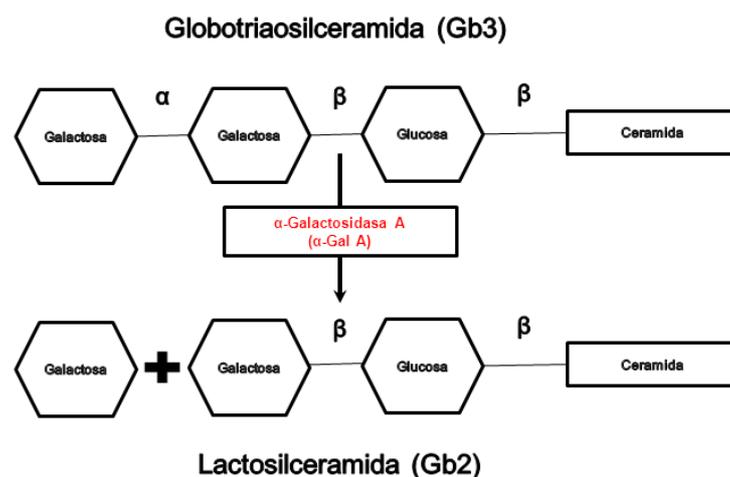
NHLIB EE.UU.	Instituto nacional para el corazón, pulmón y la sangre de EE.UU.
NCBI EE.UU	Centro nacional de información para biotecnología de EE.UU
O.N.	Durante toda la noche
PAA	Poliacrilamida
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PM	Peso molecular
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
RFLP's	Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción
r.p.m.	Revoluciones por minuto
RNA	Ácido ribonucleico
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa de reversa
SNP	Polimorfismo de un solo nucleótido
TAE	Tris-Acético-EDTA
TBE	Tris-Boro-EDTA
TE	Tris-Clorhídrico-EDTA
TES	Tratamiento enzimático sustitutivo
TEMED	N,N,N,N'-tetrametilendiamina
TF	Factor de transcripción
V	Voltio
V <sub>F</sub>	Volumen Final

# INTRODUCCIÓN

## 1. INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Anderson-Fabry (EF) (OMIM 301500) (<http://www.omim.org/>), también conocida como “Angiokeratoma corporis difusum” o “Lipidosis hereditaria distópica”, es una metabolopatía de tipo congénita ligada al cromosoma X que se caracteriza por un defecto en el catabolismo de glucoesfingolípidos neutros cuya consecuencia es el acúmulo de éstos en el lumen de lisosomas de diversas líneas celulares. La causa de este defecto catabólico es la alteración estructural o de los niveles intralisosomales de la enzima  $\alpha$ -Galactosidasa A ( $\alpha$ -Gal A), debido a la mutación o desregulación del gen que la codifica ubicado en el brazo largo del cromosoma X. Esta enzima tiene la función de hidrolizar los residuos  $\alpha$ -Galactosa terminales de los glucoesfingolípidos neutros.

Figura 1.1.: Defecto enzimático de la EF.



### 1.1. Antecedentes Históricos

La EF fue descrita por primera vez en el siglo XIX, concretamente en 1898 por William Anderson en Inglaterra y Johannes Fabry en Alemania de manera independiente. Ambos describieron sendos varones con erupciones cutáneas que refirieron como “ectasia de los capilares cutáneos”. En la década de los cincuenta del siglo XX, Pompen, intuyó una alteración de depósito generalizada (1). En la década de los sesenta del siglo XX, se caracterizaron los depósitos de glucoesfingolípidos en los lisosomas de individuos afectados. En la década de los ochenta del siglo XX, se identificó la enzima responsable (2) y se descifró el

gen codificante de la misma (3). Este último hito supuso la puesta en marcha de proyectos de investigación focalizados al tratamiento de la enfermedad culminando en el año 2001 con la aprobación por la Agencia Europea del Medicamento de la primera enzima recombinante para terapia humana en EF (4,5)

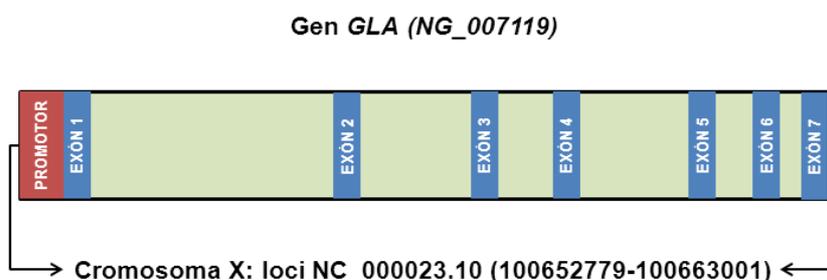
## 1.2. Epidemiología

La EF es panétnica y su prevalencia en población general fue estimada en 1 de cada 40.000 habitantes (6). Sin embargo, hay estudios que estiman prevalencias que van desde 1 de cada 476.000 (7) hasta 1 de cada 117.000 (8) en población general. Los cribados neonatales que se han realizado aumentan considerablemente la prevalencia de la EF hasta valores de 1 de cada 3.100 (9) y 1 de cada 1.250 (10) neonatos. A la vista de esta heterogeneidad de datos, la prevalencia real de la enfermedad podría estar subestimada debido al difícil diagnóstico clínico y bioquímico de la enfermedad.

## 1.3. Genética Molecular en la EF

El gen *GLA* se encuentra indicado en la base datos Gene del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>) con el número de acceso 2717. Este gen codifica la hidrolasa ácida lisosomal  $\alpha$ -Gal A (EC.3.2.1.22) y está localizado en el brazo largo del cromosoma X (Xq22.1). Está compuesto por una región promotora, siete exones cuyos tamaños están dentro del rango 92-291 pb y por seis zonas intrónicas (Figura 1.2.)

Figura 1.2.: Estructura del gen *GLA*.



Zonas intrónicas en verde. El tamaño de exones e intrones no se encuentra a escala.

La región codificante presenta un tamaño de 1292 pb y codifica para una proteína de 429 aminoácidos.

El gen *GLA* humano presenta como peculiaridad que carece de zona 3' no transcrita (3'-UTR); consecuentemente, la señal de poliadenilación del RNA mensajero (mRNA) se encuentra en la zona codificante (11).

LA EF presenta un modelo de herencia ligada al cromosoma X (12) por lo que las mujeres segregarán a la descendencia el alelo defectuoso al 50% de ella mientras que los varones lo segregarán al 100% de la misma.

### 1.3.1. Mutaciones en el gen *GLA*

Se han descrito más de 650 variantes en el gen *GLA*, todas ellas recogidas en la base de datos de mutaciones en genes humanos (HGMD) del Instituto de Genética Médica de Cardiff (<http://www.hgmd.cf.ac.uk/>). Aproximadamente, el 75% de las indizadas son variaciones puntuales (cambio de aminoácido, generación de codo de parada prematuro, de ajuste o polimorfismos) y el 25 % restante corresponden a pequeños reordenamientos (deleciones y duplicaciones).

En enfermedades de baja prevalencia en población general o “enfermedades raras” (< 5 de cada 10.000 habitantes, en Unión Europea) como es el caso de la EF, la frecuencia de aparición de mutaciones privadas es muy elevada. Estas se identifican “de novo” exclusivamente en núcleos familiares concretos. El estudio de las variantes es en muchas ocasiones complicado ya que hay variantes que implicarían cambio de aminoácido en el polipéptido, pero “in silico” e “in vitro” están causando la enfermedad por alteración del patrón de ajuste fisiológico del mRNA inmaduro (13). Otro ejemplo lo constituyen algunas variantes intrónicas (c.639+81 C>T o c.639+919 G>A) que al igual que las anteriores, alteran el patrón de ajuste fisiológico (14,15). Otro ejemplo de la complejidad lo representan las variantes de carácter polimórfico (presentes en >1% de la población), detectadas solas o en conjunto, en pacientes con sintomatología de EF (16-19). Por último un caso muy representativo de la complejidad, lo constituyen algunas variantes como c.-30 a>g (20,21) o c.937

G>T (p.D313Y) (22-24) en las que los diferentes grupos de investigación no unifican su criterio respecto al carácter patogénico o polimórfico de las mismas.

### 1.3.2. Correlación genotipo-fenotipo

En la EF es difícil establecer una correlación entre el genotipo identificado con el fenotipo desarrollado debido entre otros motivos al carácter privado de algunas mutaciones, por lo que el desarrollo del fenotipo dependerá de cada mutación. Incluso la variabilidad fenotípica intrafamiliar, para individuos portadores de la misma mutación, es alta.

Teniendo en cuenta las consideraciones anteriores, generalmente se asocia un fenotipo “clásico” a mutaciones que afectan al centro activo y/o a la estabilidad conformacional de la enzima, mientras que se asocia un fenotipo “atípico” a mutaciones alejadas del centro activo de la enzima o bien que desregulen la expresión de ésta. En este último fenotipo, la actividad residual de la enzima juega un papel importante en el retraso en la aparición de los síntomas de la EF. Con el conocimiento actual sobre el desarrollo natural de la enfermedad, se ha propuesto que resultaría más apropiado describir la EF como una enfermedad con amplio espectro de fenotipos clínicos heterogéneos y progresivos (25).

### 1.3.3. La EF en las mujeres. Bases Genéticas y moleculares

En las enfermedades ligadas al cromosoma X las mujeres heterocigotas son descritas como portadoras. En la EF el término portador es erróneo, ya que las mujeres pueden no desarrollar sintomatología o bien la pueden presentar variando desde fenotipos clásicos a atípicos como lo harían los varones, incluso desarrollando más tarde que éstos la afectación de órganos como riñones y corazón (26-29).

El hecho de que las mujeres no sean meras portadoras y presenten una amplia variabilidad fenotípica podría ser explicado por los mecanismos epigenéticos de compensación de dosis génica durante la fase embrionaria, en los que se inactiva de forma aleatoria el cromosoma X paterno o materno, fenómeno conocido con el nombre de “Lyonización” por ser descubierto por la Dra Mary F

Lyon (30). Un ejemplo visual (Figura 1.3.) de este fenómeno es la aparición del color naranja en la cara de las hembras felinas. El color naranja en esta especie está codificado por el locus O-o localizado en el cromosoma X; una hembra heterocigota para ese locus (Oo) expresará un fenotipo mosaico en su cara, con zonas naranjas y no naranjas.

**Figura 1.3.: Expresión fenotípica del mosaicismo germinal del locus O-o en la cara de gatas carey.**



La epigenética es un evento de regulación del DNA involucrado en la implementación del programa genético durante la vida de la célula; además no modifica la secuencia nucleotídica del DNA, es estable y heredable tanto en células somáticas como gaméticas. Los principales mecanismos de regulación epigenética son:

- a. Modificación covalente del DNA (Metilación): adición enzimática, por medio de metil transferasas, de un grupo metilo a la base nitrogenada de citosinas que preceden a guaninas (dinucleótidos CpG) principalmente, formando 5-metilcitosina e inactivando así la expresión génica. Es el principal mecanismo de regulación epigenética.
- b. Modificación covalente de Histonas (Deacetilación): eliminación enzimática, por medio de histona-deacetilasas de los grupos acetilo unidos a residuos de Lisina del extremo aminoterminal de alguna de las Histonas que intervienen en la formación del nucleosoma e inactivando así la expresión génica.

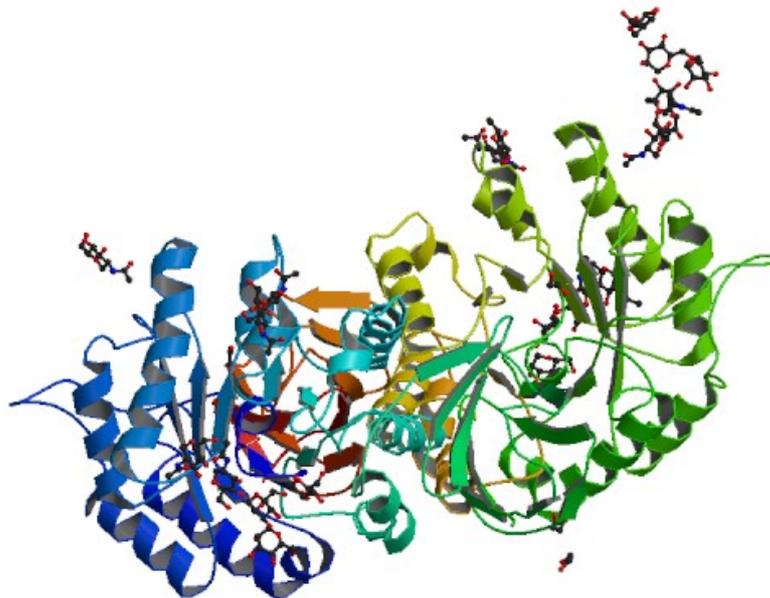
c. Ácidos Ribonucleicos (RNAs) no codificantes.

1.3.4. Estructura enzimática

La estructura cristalina de la enzima (Figura 1.3.) se resolvió en el año 2004 (31) y se encuentra indizada en la base de datos PDB (<http://www.rcsb.org/pdb/>) con el código 1R46.

La enzima se encuentra glicosilada y se pliega formando homodímeros en los que en cada uno de los monómeros presenta 2 dominios. El dominio aminoterminal (residuo 32 al 328) es una estructura de barril de 8  $\alpha$ -hélices/láminas- $\beta$  que contiene el centro activo de la enzima; el dominio carboxiterminal (residuo 329 a 421) es una estructura tipo sándwich  $\beta$  de 8 láminas- $\beta$  antiparalelas.

**Figura 1.4.: Estructura tridimensional de la enzima  $\alpha$ -Gal A.**



1.3.5. Fisiopatología de la EF

Los glucoesfingolípidos son moléculas que forman parte de las membranas plasmáticas de las células de los tejidos del organismo. Puesto que el recambio de eritrocitos se produce con una elevada tasa, la degradación de sus membranas en los órganos del sistema retículo-endotelial por los monocitos

residentes en ellos, supone la principal fuente de glucoesfingolípidos. El glucoesfingolípido mayoritario en la membrana de los eritrocitos es la Globotetraosilceramida (Gb4) que será catabolizado por la enzima hexosaminidasa B a Globotriaosilceramida (Gb3). En la EF el defecto enzimático tiene como consecuencia el acúmulo de este glucoesfingolípido mayoritariamente, aunque también se pueden acumular otros como Galabiosilceramida (Ga2), Globotriaosilesfingosina (Lyso-Gb3) y antígenos sanguíneos del grupo B y P<sub>1</sub>. (32).

#### **1.4. Características clínicas**

La afectación en la EF se puede producir a nivel multiorgánico o bien quedar afectado un solo órgano o tejido.

##### *1.4.1. Síntomas tempranos*

La principal sintomatología que se presenta en los enfermos pediátricos son las “Crisis de Fabry”, que consisten en un dolor agudo y ardiente que comienza en las zonas distales de las extremidades irradiando hacia otras partes del cuerpo. No es el único síntoma característico de la infancia/adolescencia si no que también se reporta hipo o anhidrosis (escasez o falta de sudoración), lesiones dérmicas por aparición de una erupción cutánea (“angiokeratoma”) color burdeos en la zona de las nalgas zona inguinal y ombligo, opacidad corneal (“cornea verticillata”) y vasculopatía retinal (Figura 1.5.).

Hacia la adolescencia y segunda década de la vida aparecen disfunciones renales, cerebrovasculares y cardíacas.

**Figura 1.5.: Angiokeratoma y “Cornea Verticillata”.**

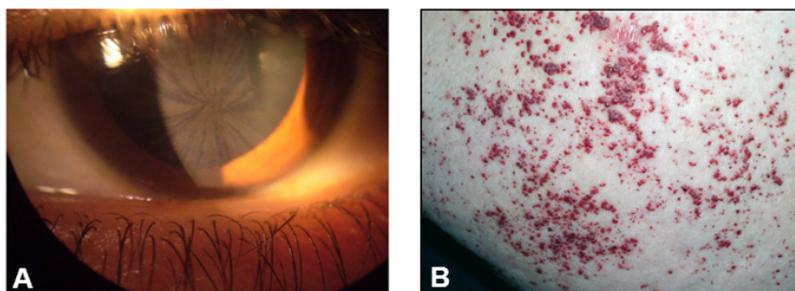


Imagen A: “Cornea Verticillata”. Imagen B: Angiokeratoma. Adaptado de Germain D.P.

#### *1.4.2. Afectación renal*

El depósito de glucoesfingolípidos tiene lugar en todas las líneas celulares del riñón, tomando importancia los que se producen en podocitos y en el endotelio vascular del glomérulo.

El síntoma inicial es la microalbuminuria y conforme avanza el progreso de los depósitos, y por tanto de la EF, se produce degeneración glomerular, exhibiendo albuminuria o proteinuria, glomeruloesclerosis y finalmente insuficiencia renal requiriendo trasplante de riñón.

#### *1.4.3. Afectación cardíaca*

El depósito de glucoesfingolípidos se produce principalmente en endocardio y miocardio, además del endotelio de la red coronaria.

Se ha comprobado que entre un 40-60% de pacientes con EF padecen algún síntoma cardíaco como hipertrofia de ventrículo izquierdo (HVI), alteraciones de la conducción, angor y disnea como consecuencia de la insuficiencia cardíaca debida a HVI (33). La disfunción diastólica y la HVI concéntrica son los rasgos característicos de la afectación cardíaca en la EF (34), aunque también se observa alteración electrocardiográfica, infarto de miocardio y en estadios finales insuficiencia cardíaca.

#### 1.4.4. Afectación cerebrovascular

El depósito de glucoesfingolípos se produce principalmente en el endotelio vascular del sistema nervioso central por lo que las lesiones provienen fundamentalmente por fenómenos trombóticos cuya máxima gravedad se alcanza con el ictus. La prevalencia de del ictus en EF es mayor que en población general de la misma edad (datos de Fabry Registry<sup>®</sup> y Fabry Outcome Survey) (ver enlaces).

### **1.5. Diagnóstico**

La edad media de diagnóstico de la EF para varones es de 25,7±15,3 años, mientras que las para mujeres es de 31,3±17,4 años, con un retraso medio desde el diagnóstico hasta la aparición de síntomas de 12 años (35).

Una vez se cuenta con la sospecha clínica es necesario confirmarla en el laboratorio.

#### 1.5.1. Diagnóstico enzimático

La actividad enzimática de  $\alpha$ -Gal A se lleva a cabo en muestras de suero/plasma y leucocitos mediante el uso de un sustrato artificial (4-metilumbeliferil- $\alpha$ D-Galactopiranosido) a pH de 4,6 (36); se incorpora N-Acetilgalactosamina para inhibir la enzima  $\alpha$ -Galactosidasa B ( $\alpha$ -Gal B) responsable de casi el 20 % de la actividad en plasma y de casi el 10% en leucocitos. (37).

Este método de diagnóstico es útil para detectar varones que respondan a un fenotipo clásico con un nivel de actividad residual bajo; en el caso de fenotipos con variantes atípicas o de pacientes heterocigotos, el método diagnóstico más apropiado es el análisis mutacional del gen codificante.

Para estudios de cribado poblacional se han propuesto técnicas basadas en gota de sangre seca (DBS), detectando perfectamente varones con fenotipo clásico.

#### 1.5.2. Diagnóstico genético

El análisis de la secuencia del gen *GLA* es el método de diagnóstico más eficaz, y resulta imprescindible para caracterizar a los pacientes heterocigotos. Con el método de Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) y Secuenciación Sanger combinada con electroforesis capilar, somos capaces de detectar el 90% de las mutaciones. El porcentaje restante requerirá de otro tipo de técnicas como puede ser “Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification” (MLPA) para estudio de grandes reordenamientos (38,39), PCR cuantitativa (qPCR) etc. (15).

### 1.5.3. Detección de productos de acúmulo

El acúmulo de sustrato en la EF tanto en orina como en plasma es una característica común en muchos de los pacientes pero no en todos. A pesar de esto la determinación de los niveles de acúmulo permite ayudar en la confirmación de un diagnóstico e incluso ver la evolución de un tratamiento. La técnica más utilizada es la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y varias formas de espectrometría de masas.

Aunque el sustrato de acúmulo mayoritario es Gb3, se ha visto que Lyso-Gb3 está elevada en plasma de varones y de mujeres sintomáticas (40).

### 1.5.4. Marcadores biológicos

Los biomarcadores son moléculas biológicas que se utilizan como indicadores de un proceso biológico; deben cumplir con una serie de requisitos como poderse medir de manera sencilla y objetiva, ser informativos y reflejar un estado fisiológico, patológico o de respuesta a tratamiento.

Para la EF no hay buenos biomarcadores en plasma y orina constituyendo uno de los principales retos en la investigación básica.

Los niveles Gb3 se incrementan en varones, pero en mujeres puede pasar desapercibidos. La determinación de niveles de Lyso-Gb3 se ha propuesto como un biomarcador interesante para el seguimiento del tratamiento enzimático sustitutivo (TES) (40).

## **1.6. Tratamiento**

La síntesis de las primeras enzimas recombinantes humanas fue toda una revolución en el ámbito terapéutico, ya que antes de ese hito sólo se realizaban tratamientos paliativos de la enfermedad. Posteriormente aparecieron otras opciones de tratamiento a TES, algunas de ellas todavía hoy en diversas fases de ensayo clínico.

#### 1.6.1. Tratamiento enzimático sustitutivo (TES)

En este tipo de tratamiento la reducción de niveles de acúmulo de sustrato se produce por administración intravenosa (infusión) de la enzima recombinante.

En el año 2001, la Agencia Europea del Medicamento aprobó, con fines terapéuticos, el uso de la enzima recombinante humana  $\alpha$ -GAL A. En la actualidad existen 2 preparados comerciales, cuya eficacia está probada:

- Algasidasa  $\alpha$  (Replagal<sup>®</sup>, Shire HGT): producida a partir de líneas de fibroblastos humanos de la piel. Presenta una serie de características como: requiere dosis menores para lograr el mismo objetivo terapéutico (0,2 mg/Kg cada 2 semanas), el patrón de glicosilación es propio de líneas celulares humanas facilitando incorporación al citosol y eliminando problemas de inmunoreactividad.
- Algasidasa  $\beta$  (Fabrazyme<sup>®</sup>, Genzyme-Sanofi): producida a partir de líneas celular de ovario de hámster chino. Presenta una serie de características como: requiere dosis mayores para lograr el mismo objetivo terapéutico (1 mg/Kg cada 2 semanas), el patrón de glicosilación es diferente de líneas celulares humanas dificultando en ocasiones la incorporación al citosol y con algún problema de inmunoreactividad.

Para eliminar muchas de las limitaciones de TES es importante realizar un diagnóstico precoz de la enfermedad para comenzar cuanto antes el tratamiento.

#### 1.6.2. Tratamiento por reducción de sustrato

En este tipo de tratamiento la reducción de niveles de acúmulo de sustrato se produce por la depleción de los niveles de ceramida, inhibiendo la enzima responsable de su síntesis (glucosilceramida sintasa).

El producto utilizado en fase de ensayo clínico ha sido la N-Butildeoxinojirimicina (Zavesza<sup>®</sup>, Actelion Pharmaceuticals) sin demasiado éxito en la EF, aunque es usado a pesar de sus efectos gastrointestinales adversos en Enfermedad de Gaucher.

### 1.6.3. Terapia con chaperonas moleculares

En este tipo de tratamiento la aproximación terapéutica consiste en la intervención del tráfico intracelular de la enzima desde el retículo endoplásmico hasta el lisosoma.

La mayoría de mutaciones que tienen lugar en la EF son mutaciones puntuales generando proteínas anómalas que no son conformacionalmente estables y por tanto sufrirán degradación vía proteasoma sin que la enzima funcional llegue al lisosoma. Si esas proteínas conformacionalmente aberrantes fueran estabilizadas podrían llegar al lisosoma y mantener un cierto nivel de actividad enzimática.

Basado en este concepto se han sintetizado imino azúcares cuya afinidad por el centro activo de la enzima es alta y permiten estabilizar formas de plegamiento intermedias. Para su aplicación se requiere de un análisis de caracterización de la mutación detectada en cada paciente para administrar la chaperona más idónea (aproximación farmacogenética).

El producto que se está investigando en fase de 3 de ensayos clínicos es la 1-Deoxigalactonojirimicina (DGJ) (Amigal<sup>™</sup>, Amicus). Esta mimetiza la  $\alpha$ -Galactosa de Gb3, estabilizando y facilitando el tráfico al lisosoma de la enzima defectuosa.

## OBJETIVOS

## 2. OBJETIVOS

La EF es una metabolopatía congénita (ligada al cromosoma X) causada por un defecto estructural y/o funcional de la hidrolasa ácida lisosomal  $\alpha$ -Gal A. Este defecto conduce al depósito anómalo y progresivo de sustratos glucolípidicos en el lumen de los lisosomas de varias estirpes celulares siendo, el depósito de mayor importancia fisiopatológica, aquel que se produce en el endotelio vascular (1).

Desde el punto de vista clínico la EF se trata de una patología multisistémica, de carácter grave, en el que se ven comprometidos diferentes órganos o sistemas (riñones, sistema nervioso central y/o periférico, piel...) entre los que se encuentra el corazón. En este órgano, el acúmulo intracelular se produce en el endotelio vascular coronario, endocardio y miocardio desencadenando alteraciones estructurales y/o funcionales del corazón como la hipertrofia ventricular izquierda (HVI) entre otras.

Desde el punto de vista epidemiológico, se desconoce la prevalencia real de la EF, debido a la complejidad diagnóstica de la enfermedad y a la variabilidad en cuanto a criterios de cribado (2,3), por lo que no se cuenta con un valor fiable de incidencia en población general y menos si cabe en población EF cuyo único síntoma es la HVI (4-7).

Teniendo en cuenta estas consideraciones, decidimos llevar a cabo un estudio multidisciplinar y multicéntrico.

El objetivo principal de este trabajo fue:

Conocer la incidencia de la Enfermedad de Fabry en pacientes (mujeres y varones) diagnosticados de miocardiopatía hipertrófica ventricular izquierda (MHVI) de etiología desconocida.

Los objetivos secundarios fueron:

1. Valorar la capacidad de cribado en la EF, de un método de análisis enzimático y genético basado en gota de sangre seca (DBS) sobre papel de filtro tipo FTA.

2. Identificar las variantes (polimorfismos y mutaciones) en el gen *GLA*, en una muestra de pacientes con MHVI, causales de esta forma de expresión de EF.
3. Caracterizar funcionalmente algunas de las variantes nuevas que se identifiquen en el gen *GLA*.

# MATERIALES Y METODOLOGÍA

### **3. MATERIALES Y METODOLOGÍA**

#### **3.1. Pacientes y controles**

La población de estudio se constituyó en 375 pacientes, cuya distribución por sexos fue 66,4% varones y 33,6% mujeres; todos ellos mayores de edad (rango: 18-92 años) y con un Índice de masa corporal (IMC) de  $28,3 \pm 4,86$  Kg/m<sup>2</sup> (valores expresados como media  $\pm$  desviación estándar).

Los 375 pacientes, en el momento de su reclutamiento, fueron valorados y diagnosticados como afectados de miocardiopatía hipertrófica de ventrículo izquierdo (MHVI). Todos ellos cumplían con los criterios clínicos de inclusión del estudio y no cumplían con todos los criterios de exclusión del mismo.

#### **CRITERIOS DE INCLUSIÓN:**

- Pacientes de cualquier sexo con edad igual o mayor de 18 años.
- Pacientes con MHVI de causa no determinada (espesor de la pared septal y/o posterior  $> 15$ mm). Se incluyeron aquellos pacientes que presentaban estenosis aórtica ligera (gradiente medio  $< 20$  mm Hg o área valvular aórtica  $> 1,5$  cm<sup>2</sup>) o Hipertensión arterial (HTA) ligera (sistólica  $< 160$  mm Hg y/o diastólica  $< 95$  mm Hg) no relacionada con la MHVI.
- Pacientes no relacionados (se incluyó un paciente por familia).
- Pacientes que firmaron el consentimiento informado pertinente.

#### **CRITERIOS DE EXCLUSIÓN:**

- Pacientes con una MHVI secundaria a causa orgánica: estenosis aórtica moderada o grave, HTA, coartación aórtica.
- Pacientes con una MHVI debida a causa genética conocida.
- Pacientes con una MHVI cuyo patrón de herencia fuese no concordante con el patrón de herencia de la EF (ligado al cromosoma X).

El reclutamiento se realizó; bien de manera retrospectiva (pacientes que se encontraron en seguimiento en el momento de comienzo del estudio), bien de manera prospectiva (pacientes de nuevo diagnóstico en las consultas externas

o derivados a éstas) en las consultas externas de cardiología de ocho centros hospitalarios españoles, durante un período de nueve meses desde el reclutamiento del primer paciente o hasta alcanzar el número de 600 pacientes entre los 8 centros participantes:

1. Hospital General Universitario de Alicante.
2. Hospital Universitario Puerta de Hierro de Majadahonda.
3. Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela.
4. Universidad de Murcia.
5. Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca de Murcia.
6. Hospital de Son Llatzer de Palma de Mallorca.
7. Hospital General Universitario de Elche.
8. Hospital Universitario de Donostia.

Individuos control para determinación de actividad enzimática en gota de sangre seca (DBS): con el fin de normalizar resultados, tanto intra como intercentro, se solicitó a cada uno de los centros que aportasen mínimo 5 individuos sanos varones y 5 individuos sanos mujeres sin signos ni síntomas de la EF. En total fueron 73 controles.

Para el resto de determinaciones, se utilizaron como individuos control varones y mujeres procedentes de la colección de muestras de Enfermedad de Gaucher y otras enfermedades de depósito lisosomal del Departamento de Bioquímica, Biología Molecular y Celular de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Zaragoza.

Todos los pacientes y controles fueron informados verbalmente y por escrito, de los objetivos y metodología a seguir en este estudio, aceptando de manera voluntaria su participación en el mismo y firmando el correspondiente consentimiento informado, autorizando el uso en investigación de las muestras biológicas que les fueron extraídas.

Este estudio fue aprobado el 30 de Marzo de 2011 por el Comité de Ética de Investigación Clínica de la Comunidad Valenciana (CEICCV) de la Agència Valenciana de Salut (Alicante) y categorizado el 20 de Enero de 2011 como “Estudio Observacional No Posautorización (No-EPA)” por la Subdirección General de Medicamentos de uso Humano de la Agencia Española de

Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS). La investigación fue llevada a cabo según los principios de la Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial de 1975 y su posterior revisión en el año 2000, así como por las normas de buenas prácticas clínicas descritas en las Directrices de la Conferencia Internacional de Armonización (ICH) GCP.

### **3.2. Estudio ecocardiográfico**

Los estudios ecocardiográficos se llevaron a cabo por los médicos especialistas de cada una de las consultas externas de cardiología de los ocho centros participantes, siguiendo las recomendaciones de la Sociedad Americana de Ecocardiografía (1).

Brevemente, todas las medidas fueron tomadas con el paciente en posición de decúbito lateral izquierdo y en teleespiración. Se obtuvieron tandas de mayor o igual 3 ciclos. Todas las exploraciones se realizaron bajo monitorización con el sistema de tres electrodos incorporados en el ecocardiógrafo proporcionando una única derivación electrocardiográfica, visible en la pantalla para establecer la sincronización apropiada.

Se obtuvieron imágenes en las proyecciones parasternal eje largo, corto, apical de 4, 2 y 3 cámaras

### **3.3. Extracción de sangre periférica**

#### 3.3.1. Cribado enzimático y genético en DBS sobre tarjeta con filtro tipo FTA

Las muestras se obtuvieron en las consultas externas de cardiología de los diferentes centros (2-8) y se enviaron convenientemente a nuestro laboratorio.

Las muestras de sangre se recogieron mediante flebotomía de la vena cubital o por venipunción digital (9), recogiendo un volumen variable de sangre venosa en viales con el anticoagulante sal dipotásica del ácido etilendiaminotetraacético (K<sub>2</sub>EDTA) (1mg/mL). A continuación se homogeneizó el tubo, mediante inversión suave y se tomaron 35 µL de la muestra con micropipeta, depositándose de forma continua en cada una de las áreas

delimitadas de las tarjetas tipo FTA Whatman nº 903 (REF. 535078, Whatman™, GE Healthcare™). (Figura 3.1.)

**Figura 3.1.: Modelo de tarjeta tipo FTA para recogida y envío de muestras.**

DIAGNÓSTICO DE ENFERMEDADES LISOSOMALES DE DEPÓSITO

Nombre/Código del paciente: FAU-AL01-010

Diagnóstico: Enfermedad de Fabry  Enfermedad de Gaucher

Edad: 53 Sexo: H  M  Fecha recogida de la muestra: 26-09-2011

Hospital: HOSPITAL GENERAL PLACANTE

Médico solicitante: [REDACTED]

Teléfono contacto: [REDACTED] Email: [REDACTED]

Enviar: Prof. Miguel Pocovi  
Laboratorio de Lípidos  
Departamento de Bioquímica, Biología Molecular y Celular  
Facultad de Ciencias. Universidad de Zaragoza  
50009 Zaragoza. Spain

FEETEG

Copia para el Laboratorio

Whatman 903®  
REF 535078 LOT W-092

Tras depositar la sangre, se codificó apropiadamente la tarjeta para realizar estudios posteriores de forma anónima procediendo a su posterior secado durante dos horas a temperatura ambiente y humedad relativa ambiente. Finalizado el secado, las tarjetas se conservaron dentro de una bolsa de plástico de cierre hermético (eliminando el aire residual) a 4 °C durante un período máximo de tres días hasta el momento de envío al laboratorio.

### 3.3.2. Estudios complementarios

Todos aquellos pacientes que requirieron estudios complementarios para poder confirmar/completar/ampliar su diagnóstico, se les solicitó a las consultas externas de los diferentes centros que extrajeran 9 mL de sangre periférica en viales con K<sub>2</sub>EDTA (véase apartado 3.3.1. de este mismo capítulo). Se solicitaron también 5 mL de sangre periférica en viales PAXgene® Blood RNA tube (PreAnalytix™, Becton Dickinson™/Quiagen™) de 2,5 mL (metodología de extracción según recomendación del fabricante) para la estabilización del RNA total.

Las muestras complementarias se codificaron con el mismo código de paciente que se les asignó a las tarjetas de DBS para realizar todos los estudios posteriores de forma anónima. Se enviaron el mismo día de la extracción, mediante servicio de mensajería, manteniéndolas refrigeradas (no congeladas) durante el transporte.

Una vez en el laboratorio:

- Vial con 9 mL de sangre en K<sub>2</sub>EDTA: Se separó el plasma de las células sanguíneas mediante centrifugación a 2.000 x r.p.m. durante 10 minutos a temperatura ambiente en centrífuga Allegra<sup>®</sup> X-15R (Beckman Coulter<sup>™</sup>); la fase superior (plasma) se alicuotó convenientemente en microtubos de 1,5 mL (Daslab) previamente codificados que se conservaron a -80°C para estudios posteriores. Se reconstituyó el volumen de plasma extraído añadiendo el mismo volumen de una solución de suero salino NaCl 0,9 % (p/v) estéril para evitar alterar la concentración de elementos celulares.

De este reconstituido, se separó un volumen de 3 mL que se congeló a -20°C para extraer DNA a posteriori, mientras que los otros 6 mL restantes se utilizaron para obtener un concentrado de leucocitos.

- Vial PAXgene<sup>®</sup> Blood RNA tube (PreAnalytix<sup>™</sup>, Becton Dickinson<sup>™</sup>/Quiagen<sup>™</sup>) con 2,5 mL de sangre periférica: se congelaron a -20°C y al día siguiente se almacenaron a -80°C para procesarlos a posteriori.

### **3.4. Obtención de un concentrado de leucocitos a partir de sangre periférica**

El concentrado de leucocitos se obtuvo a partir de 6 mL de sangre periférica en viales K<sub>2</sub>EDTA, no congelada previamente y reconstituida con suero salino estéril (véase apartado 3.3.2. de este mismo capítulo).

Para proceder con la separación por gradiente continuo de densidad se mezcló en una jeringa de 20 mL (Terumo<sup>®</sup>) los 6 mL de sangre reconstituida, con 5 mL de Dextrano al 6% (p/v) disuelto en suero salino estéril (PM = 282 g/mol; Sigma- Aldrich<sup>®</sup>); se homogeneizó suavemente por inversión el contenido.

Durante una hora y media se dejaron separar las diversas fases celulares por gravimetría. Pasado ese tiempo se recogió la fase superior “color pajizo” en un tubo de fondo cónico de 15 mL (TPP®), evitando tomar contenido de la fase “roja” del concentrado de hematíes. La fase recogida se centrifugó a 2.000 x r.p.m. durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se decantó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió con 1 mL de suero salino estéril; se añadió 5 mL de NH<sub>4</sub>Cl 0,83 % (p/v) disuelto en agua desionizada estéril, se homogenizó por inversión suave y se dejó incubar la muestra durante 5 minutos a temperatura ambiente. Pasado ese tiempo se centrifugó a 2.000 x r.p.m. durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se decantó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió con 5 mL de suero salino estéril, para después ser centrifugado 2.000 x r.p.m. durante 10 minutos a temperatura ambiente. El precipitado limpio de hematíes, se resuspendió en 2 mL de suero salino estéril y se dividió entre 2 microtubos de 1,5 mL. Para finalizar se centrifugaron los microtubos en una microfuga Eppendorf™ 5145C a 10.000 x r.p.m. durante 30 segundos a temperatura ambiente, se decantó el sobrenadante y los precipitados se congelaron a – 80°C para estudios posteriores.

### **3.5. Aislamiento de DNA genómico**

#### ***3.5.1. Procedente de muestra DBS sobre tarjeta tipo FTA***

El DNA genómico se obtuvo de gotas de sangre seca en tarjetas tipo FTA, aplicando protocolo modificado de la casa comercial proveedora de las tarjetas. Brevemente, mediante un troquel se obtuvo un disco de 3 mm de diámetro (Ø) impregnado de sangre seca que se depositó en un microtubo de 1,5 mL convenientemente codificado. Se le añadió 300 µL de agua ultrapura libre de DNAasas/RNasas (ddH<sub>2</sub>O) (Gibco®, Life technologies™), se homogeneizó con un pulso de vórtice, se dio un pulso de microfuga y se dejó incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente. Pasado ese tiempo se eliminó el sobrenadante mediante pipeteo y se repitió la operación 2 veces más. Finalizado el lavado del disco, se procedió a eluir el DNA genómico mediante lisis alcalina con 35 µL de la Solución 1 (0,1 N NaOH 0,3 mM EDTA pH = 13,0)

incubándolo 5 minutos a temperatura ambiente. Se neutralizó la lisis alcalina añadiendo 65  $\mu$ L de la Solución 2 (0,1 M Tris-HCl pH =7,0), homogeneizando e incubándolo durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó a 10.000 x r.p.m durante 30 segundos a temperatura ambiente y se recogió el sobrenadante (DNA genómico disuelto en 66mM Tris-HCl 0,1 mM EDTA) con micropipeta para transferirlo a un microtubo de 0,5 mL (Daslab) convenientemente codificado.

El DNA eluido se conservó, bien 3 días a 4°C, bien 3 meses a -20°C; para periodos de conservación más amplios se congeló a -80°C.

La tarjeta FTA se conservó en una bolsa de cierre hermético con un desecante a 4°C para estudios posteriores.(10)

### 3.5.2. Procedente de muestra de sangre periférica

El DNA genómico se obtuvo de sangre periférica reconstituida con suero salino fisiológico (véase apartado 3.3.2. de este mismo capítulo) tras descongelación a 4°C. Se utilizó la batería de reactivos Nucleon Bacc 3 Genomic DNA extraction Kit<sup>®</sup> (Illustra<sup>™</sup>, GE Healthcare<sup>™</sup>) siguiendo las instrucciones del fabricante. El único reactivo no incluido en este kit fue Cloroformo (Carlo Erba) Al DNA genómico aislado, se le añadió un volumen variable de TE 1x (Tris-HCl 10 mM EDTA 1 mM pH = 8,0) en función del precipitado observado, y dejó hidratándose durante toda la noche en un agitador orbital.

Una vez resuspendido se conservó a 4°C para estudios a corto-medio plazo o se conservó a -20°C para estudios a largo plazo.

### **3.6. Aislamiento de RNA total**

El RNA total se obtuvo a partir de sangre periférica en vial PAXgene<sup>®</sup> Blood RNA tube, tras descongelación a temperatura ambiente durante toda la noche. Se utilizó la batería de reactivos PAXgene<sup>®</sup> Blood RNA Kit (PreAnalytix<sup>™</sup>, Becton Dickinson<sup>™</sup>/Quiagen<sup>™</sup>) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para las etapas de centrifugado de tubos se utilizó la centrífuga refrigerada Eppendorf<sup>™</sup> mod. 5810R, mientras que para las etapas de centrifugado de

microtubos/columnas/microtubos colectores se utilizó la microfuga refrigerada Ortoalresa mod. Digicen21R (Ortoalresa).

Una vez eluida la columna, se procedió con lo especificado en el apartado 3.7. manteniendo las muestras sumergidas en baño de hielo. Finalmente se conservó el RNA total a  $-80^{\circ}\text{C}$  para estudios posteriores.

### **3.7. Análisis de concentración, pureza y purificación de ácidos nucleicos aislados (DNA genómico y RNA total)**

Los ácidos nucleicos, debido a las estructuras aromáticas de sus bases nitrogenadas, absorben radiación electromagnética en la zona del espectro del ultravioleta cercano (máximo de absorción  $\lambda = 260 \text{ nm}$ ) lo que permite determinar su concentración.

Las proteínas, debido a la presencia de residuos aromáticos en su estructura, absorben en la zona del espectro del ultravioleta cercano (máximo de absorción  $\lambda = 280 \text{ nm}$ ) lo que permite determinar su concentración.

Mediante el cociente Absorción a 260 nm/Absorción a 280 nm se determinó la pureza de los ácidos nucleicos aislados, considerándose valores aceptables, para posteriores ensayos moleculares, cuando el rango del cociente era de 1,8 a 2.

Si no se superaban los criterios de pureza se procedía a su purificación.

#### **3.8.1. Concentración y pureza del DNA genómico:**

El DNA genómico aislado y completamente rehidratado (véase apartado 3.5.2. de este mismo capítulo) se procedió a cuantificar su concentración y determinar su pureza mediante espectrofotometría de absorción ultravioleta con el espectrofotómetro NanoVue™ (GE Healthcare™) a  $\lambda = 260 \text{ nm}$  y  $280 \text{ nm}$ .

#### **3.8.2. Concentración y pureza del RNA total:**

El RNA total aislado (véase apartado 3.6. de este mismo capítulo) se procedió a cuantificar su concentración y determinar su pureza mediante espectrofotometría de absorción ultravioleta con el espectrofotómetro NanoDrop 2000C (Thermo Scientific) a  $\lambda = 260 \text{ nm}$  y  $280 \text{ nm}$ .

#### **3.8.3. Purificación del DNA genómico o del RNA total**

Para purificar DNA genómico o RNA total, se añadió en un microtubo de volumen adecuado que contenía una alícuota de los ácidos nucleicos, 0,1 volúmenes de acetato sódico 3 M pH = 5,2 (Sigma - Aldrich®) y 2,5 volúmenes de etanol absoluto a -20°C (Panreac™); se homogeneizó mediante agitación mecánica y se dejó precipitar durante 1 hora a -20°C. Pasado ese tiempo se centrifugaron los microtubos en una microfuga a 13.500 x r.p.m. durante 20 minutos, eliminando posteriormente el sobrenadante por decantación. A continuación se procedió a lavar el precipitado con 500 µL de etanol 70 % (v/v) a -20 °C, homogeneizándose por inversión suave. Se centrifugaron los microtubos a 13.500 x r.p.m. durante 20 minutos, eliminando el sobrenadante por decantación. Esta operación de lavado se repitió y el precipitado se desecó al aire hasta que se evaporaron las microgotas residuales de etanol.

En el caso del precipitado a partir de DNA genómico: el precipitado se resuspendió en 50-100 µL de TE 1x (Tris-HCl 10 mM EDTA 1 mM pH = 8,0) y se dejó hidratando durante toda la noche en un agitador orbital. Al día siguiente se procedió a cuantificar y determinar su pureza (véase apartado 3.7.1. de este mismo capítulo).

En el caso del precipitado a partir de RNA total: el precipitado se resuspendió en 30µL de ddH<sub>2</sub>O libre de DNAasas/RNAsas y se homogeneizó mediante pipeteo suave; se colocó en baño de hielo y se procedió a cuantificar y determinar su pureza (véase apartado 3.7.2. de este mismo capítulo).

#### 3.8.4. Determinación de la integridad del RNA:

La determinación de la integridad del RNA total aislado se llevó a cabo mediante una electroforesis durante 30 minutos a 90V (célula de electroforesis horizontal Wide mini-sub® cell GT, fuente de alimentación Power Pac™ 300; Bio-Rad) en gel de agarosa al 1% (p/v) (Ecogen) preparado con TAE 1x (Tris-Acetato 40 mM EDTA 1 mM pH = 8,0) que contenía 0,5 µg/mL de Bromuro de Etidio (Sigma – Aldrich®). En cada pocillo se añadieron 500 ng de RNA total y 2 µL de tampón de carga (azul de bromofenol), también se añadió 1 µL de marcador de bajo PM “Low DNA Mass Ladder” (Invitrogen®, Life technologies™).

El resultado se visualizó, revelando el gel en el tansiluminador Gel Doc™ 2000 (Bio-Rad).

### 3.8. Determinación de la actividad enzimática

Se realizó determinación de actividad enzimática de  $\alpha$ -Gal A en DBS sobre tarjeta tipo FTA para el cribado poblacional y en plasma y leucocitos de aquellos pacientes que los resultados de la secuenciación del gen *GLA* así lo requerían.

#### 3.8.1. En muestras de DBS sobre tarjeta tipo FTA

La determinación de la actividad de la enzima  $\alpha$ -Gal A en DBS sobre tarjeta tipo FTA se realizó según protocolo descrito previamente (2) con pequeñas modificaciones. Brevemente, de cada tarjeta tipo FTA se extrajeron 2 discos de 3 mm  $\varnothing$  de la misma área (generando 2 réplicas), mediante el uso de un troquel. Cada uno de estos discos se colocó en un microtubo de 1,5 mL (correctamente codificado) y se les añadió 70  $\mu$ L por disco de una mezcla de reacción que contenía: como sustrato específico fluorogénico de  $\alpha$ -Gal A, 50  $\mu$ L de una disolución 5 mM de 4-metilumbeliferil- $\alpha$ -D-Galactopiranosido (Sigma – Aldrich®) en tampón 0,07 M citrato/ 0,15 M fosfato pH = 4,6 (Sigma – Aldrich®) y disgregado por sonicación (B. Braun Labsonic®U, B. Braun Biotech. International) durante 1 minuto a 29W; y como inhibidor específico de  $\alpha$ -Galactosidasa B ( $\alpha$ -Gal B), 20  $\mu$ L de una disolución 0,25 M N-Acetil-D-Galactosamina (Sigma – Aldrich®) en agua desionizada estéril. La mezcla anterior se incubó a 37 °C durante 20 horas en baño termostático seco con agitación (Thermomixer®, Eppendorf™) y protegido de la luz.

La tarjeta FTA se conservó en una bolsa de cierre hermético con un desecante a 4°C para estudios posteriores.(10)

Transcurrido el tiempo de reacción, ésta se inhibió mediante la adición de 300  $\mu$ L de Etilendiamina 0,1 M pH = 11 (Sigma – Aldrich®) y posterior homogeneización con el vórtice y aplicación de un pulso de microfuga.

La medida de fluorescencia, correspondiente al fluorocromo liberado por catálisis del sustrato específico fluorogénico inicial, se llevó a cabo en el sobrenadante. Éste se añadió en una cubeta de cuarzo Suprasil de 10 x 4 mm

de paso óptico (Hellma<sup>®</sup>) y se determinó la fluorescencia a  $\lambda_{\text{absorción}} = 366 \text{ nm}$  /  $\lambda_{\text{emisión}} = 445 \text{ nm}$  mediante un fluorímetro LS-45 (Perkin Elmer<sup>®</sup>) y un filtro atenuador del 8%.

Para poder determinar la cantidad de sustrato fluorogénico catalizado, se construyeron rectas de calibrado con 9 estándares del producto fluorogénico 4-metilumbeliferona (Sigma – Aldrich<sup>®</sup>) cuyo rango era 0 - 0,5 nmoles.

Como medida de calidad de nuestro laboratorio, se aceptaban rectas cuyo coeficiente de correlación  $R^2$  fuera  $\geq 0,98$  y se rehicieron éstas tras 5 determinaciones consecutivas con la misma recta.

Como criterio de aceptación o no de un valor de actividad enzimática, se estimó que si el Coeficiente de Variación de las dos réplicas era  $\geq 30\%$ , la determinación debía repetirse. Si la misma muestra se repetía 3 veces el resultado de actividad enzimática era no aceptable y el paciente se diagnosticaba por análisis molecular del gen *GLA*.

### 3.8.2. En muestras de Plasma

La determinación de la actividad de la enzima  $\alpha$ -Gal A en plasma se realizó por duplicado, para cada muestra, añadiendo a un volumen de 100  $\mu\text{L}$  de plasma diluido ( $1/2$ ) con agua desionizada estéril, un volumen de 200  $\mu\text{L}$  por réplica de una mezcla de reacción que contenía: como sustrato específico fluorogénico de  $\alpha$ -Gal A, 100  $\mu\text{L}$  de una disolución 8,75 mM de 4-metilumbeliferil- $\alpha$ -D-Galactopiranosido en agua desionizada estéril y disgregado por sonicación posteriormente durante 1 minuto a 29W; y como tampón de reacción 100  $\mu\text{L}$  de una disolución 0,2 M citrato / 0,4 M fosfato pH = 4,6 en agua desionizada estéril. La mezcla se incubó a 37 °C durante 2 horas en baño termostático seco (Selecta P<sup>®</sup>) y protegido de la luz.

El plasma restante se conservó a -80°C para estudios posteriores.

Transcurrido el tiempo de reacción, ésta se inhibió añadiendo el producto de reacción a tubos de polipropileno de 5 mL que contenían 2,5 mL de Glicina/NaOH 0,2 M pH = 11 (Sigma – Aldrich<sup>®</sup>) y se homogenizó todo en el vórtice.

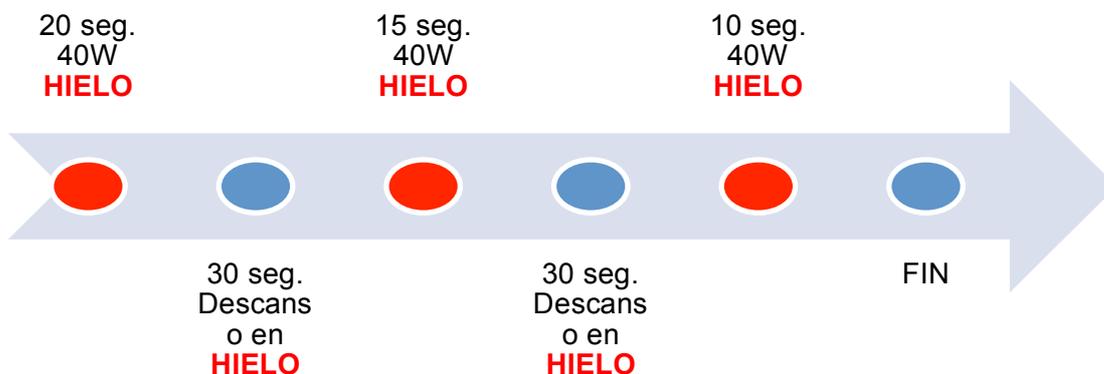
Para realizar la medida de fluorescencia se añadió todo el volumen anterior en una cubeta de cuarzo de 10 x 10 mm de paso óptico (Hellma®) y se determinó la fluorescencia a  $\lambda_{\text{absorción}} = 366 \text{ nm}$  /  $\lambda_{\text{emisión}} = 445 \text{ nm}$  mediante un fluorímetro LS-45 y un filtro atenuador del 1%.

Para poder determinar la cantidad de sustrato fluorogénico catalizado, se construyeron rectas de calibrado con 9 estándares del producto fluorogénico 4-metilumbeliferona cuyo rango era 0 - 2 nmoles. Como medida de calidad de nuestro laboratorio, se aceptaban rectas cuyo coeficiente de correlación  $R^2$  fuera  $\geq 0,98$  y se rehicieron éstas tras 5 determinaciones consecutivas con la misma recta.

### 3.8.3. En concentrados de Leucocitos

La determinación de la actividad de la enzima  $\alpha$ -Gal A en leucocitos se realizó, según protocolo descrito previamente (11) con pequeñas modificaciones. Brevemente, se realizó una etapa preparativa de lisado de leucocitos y obtención de extracto. Para ello se colocaron en un baño de hielo los precipitados de leucocitos y se añadió 300  $\mu\text{L}$  de Taurocolato sódico 1% (Sigma – Aldrich®) disuelto en agua desionizada estéril y se homogeneizaron mediante pipeteo suave. A continuación se llevó a cabo un proceso de lisado celular mediante sonicación, (Figura 3.2.) y posterior cuantificación de la cantidad de proteína total presente en el extracto, mediante espectrofotometría de absorción ultravioleta con el espectrofotómetro NanoVue™ a  $\lambda = 280 \text{ nm}$ . La concentración de proteínas se ajustó a 0,0013 mg proteína/ $\mu\text{L}$  extracto mediante dilución con Taurocolato sódico 1%.

Figura 3.2.: Proceso de sonicado de leucocitos.



El valor de cantidad de proteína total en el extracto es clave para ajustar la cantidad de extracto celular que se necesita ensayar; de esta forma los valores de actividad enzimática se encuentran dentro del rango lineal de la recta de calibrado del producto fluorogénico y además permiten la normalización del resultado de actividad enzimática.

Cada muestra se ensayó por duplicado, añadiendo a un volumen de 30  $\mu\text{L}$  de extracto celular, con la concentración de proteína ajustada a 0,0013 mg proteína/ $\mu\text{L}$  de extracto, un volumen de 90  $\mu\text{L}$  de una mezcla de reacción que contenía: como sustrato específico fluorogénico de  $\alpha$ -Gal A, 30  $\mu\text{L}$  de una disolución 14 mM de 4-metilumbeliferil- $\alpha$ -D-Galactopiranosido en agua desionizada estéril y disgregado por sonicación durante 1 minuto a 29W; como inhibidor específico de  $\alpha$ -Gal B, 30  $\mu\text{L}$  de una disolución 0,4 M de N-Acetil-D-Galactosamina en agua desionizada estéril; y como tampón de reacción 30  $\mu\text{L}$  de una disolución 0,4 M citrato / 0,8 M fosfato pH = 4,6 preparado en agua desionizada estéril. La mezcla se incubó a 37 °C durante 1 hora en baño termostático seco y protegido de la luz.

El extracto celular de leucocitos se conservó a -80°C para estudios posteriores. Transcurrido el tiempo de reacción, ésta se inhibió añadiendo el producto de reacción a tubos de polipropileno de 5 mL que contenían 3 mL de Glicina/NaOH 0,3 M pH = 10,6 y se homogeneizó en el vórtice.

La medida de fluorescencia se realizó de la misma forma que en el apartado 3.8.3. de este mismo capítulo.

Para poder determinar la cantidad de sustrato fluorogénico catalizado, se construyeron rectas de calibrado con 10 estándares del producto fluorogénico 4-metilumbeliferona cuyo rango era 0 - 5 nmoles. Como medida de calidad de nuestro laboratorio, se aceptaban rectas cuyo coeficiente de correlación  $R^2$  fuera  $\geq 0,98$  y se rehicieron éstas tras 5 determinaciones consecutivas con la misma recta.

### **3.9. Análisis molecular del gen *GLA***

Se llevó a cabo el análisis de la zona promotora, exones y nexos de unión exón-intrón mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y análisis de la secuencia nucleotídica mediante reacción de Sanger en combinación con electroforesis capilar automática.

#### ***3.9.1. Diseño, optimización y amplificación de fragmentos gen *GLA****

La secuencia genómica escogida como referencia fue NG\_007119 de la base de datos del GenBank (ver enlaces). Sobre esa secuencia de dominio público y con ayuda del software Oligo v.6.0. (Molecular Biology Insights) se diseñaron 8 parejas de cebadores (Tabla 3.1.) para amplificar las regiones de interés.

Se realizaron PCRs de los diferentes amplicones en placas de 96 pocillos precortadas (Thermo Scientific) o microtubos de 0,2 mL (Daslab) (dependiendo del número de muestras a procesar), incorporando todos los reactivos y el DNA (Tabla 3.2.) ( $V_F$  reacción = 20  $\mu$ L).

La reacción se llevó a cabo en un termociclador GeneAmp<sup>®</sup> 2720 PCR System (Applied Biosystems<sup>®</sup>, Life technologies<sup>™</sup>). Tras la fase de optimización, se utilizaron 3 programas térmicos diferentes en función del amplicón diana (Tabla 3.3.).

**Tabla 3.1.: Cebadores específicos para la amplificación de regiones de interés del gen *GLA*.**

CEBADOR	5'-SECUENCIA-3'	Ta	AMPLICIÓN
GLA_P_F	CCCACACACCAACCTCTAACGATAC	54°C	424 pb
GLA_P_R	GGTGACCGGACAGCATAAAT		
GLA_E1.1.0_F	TAGGGCGGGTCAATATCAAG	54°C	596 pb
GLA_E1.1.0_R	TCACACAGAGAAAGTTTAGG		
GLA_E2_F	GTGAAATCCCAAGGTGCCTA	54°C	345 pb
GLA_E2_R	GCCATGAGGGCTGTTTCTAA		
GLA_E3.1.0_F_F	CCCCAATACCTGGTGAAGTAA	54°C	407 pb
GLA_E3.1.0_F_R	TTTCCAGTATTGTGACAGGGTATTT		
GLA_E4.1.0_F_F	GGAAGCTGAGACAGAAGAGT	54°C	494 pb
GLA_E4.1.0_F_F	AGACACAAGGATGACTTTCC		
GLA_E5_F	GTAAACTCAAGAGAAGGCTACA	57,5°C	430 pb
GLA_E5_R	AAAGTTACCTAGATGACCCATA		
GLA_E6+IVS_F	CTCCTTGTTCAAGACCCTGCGGTAG	57,5°C	785 pb
GLA_E6+IVS_R	GGGAAGCAACTGCGATGGTATAAGA		
GLA_E7_F	CCAAACTAACAGGGCCACTT	56°C	434 pb
GLA_E7_R	ATGAGCCACCTAGCCTTGAG		

Ta= temperatura de “annealing”

**Tabla 3.2.: Estequiometría para la amplificación por PCR de los diferentes amplicones del gen *GLA***

REACTIVO	CANTIDAD (µl)	CONC. FINAL
ddH <sub>2</sub> O libre DNAasa/RNAasa	10,45	
Tampón 10 x, Bioline®	2	1x
dNTPs (2mM), Invitrogen®	2	200 µM
Mg <sub>2</sub> Cl (50mM), Bioline®	0,6	1,5 mM
Cebador Directo (10 µM)	0,4	200 nM
Cebador Reverso (10 µM)	0,4	200 nM
BIOTAQ™ DNA polimerasa 5 UI/µL, Bioline®	0,15	0,75 UI
DNA genómico de DBS	3	

Los volúmenes anteriores están referidos para 1 PCR de 1 amplicón

Tabla 3.3.: Programas térmicos para amplificar por PCR los diferentes amplicones del gen *GLA*.

NOMBRE	AMPLICONES	PROGRAMA TÉRMICO
<b>a-gla dbs 1</b>	P	94°C 5'
	E1.1.0	45 x (94°C 30'' 54°C 30'' 72°C 30'')
	E2	72 °C 7'
	E3.1.0	4 <sup>a</sup> C ∞
	E4.1.0	
<b>a-gla dbs 2</b>	E5	94°C 5'
	E6+IVS6	45 x (94°C 30'' 57,5°C 30'' 72°C 45'')
		72 °C 7'
		4 <sup>a</sup> C ∞
<b>a-gla dbs 3</b>	E7	94°C 5'
		38 x (94°C 30'' 56°C 30'' 72°C 30'')
		72 °C 7'
		4 <sup>a</sup> C ∞

El producto final de PCR se sometió a electroforesis durante 30 minutos a 90V en gel de agarosa al 2% (p/v) preparado con TAE 1x que contenía 0,5 µg/mL de Bromuro de Etidio. En cada pocillo se añadieron 2 µL de producto de PCR y 2 µL de tampón de carga (azul de bromofenol), también se cargó 1 µL de marcador de bajo PM "Low DNA Mass Ladder".

El producto de PCR se visualizó, revelando el gel en el tansiluminador Gel Doc™ 2000, determinando el tamaño de banda específico de cada amplicón mediante el software Multi-Analyst® v1.0 (Bio-Rad).

Finalmente el producto de PCR se conservó, bien a 4°C para su uso inmediato, bien a -20°C para estudios posteriores.

### 3.9.2. Purificación de Producto de PCR

Como etapa preparativa para la resecuenciación de los amplicones del gen *GLA*, utilizamos conjuntamente 2 enzimas: Exo I (Exonucleasa I) (USB®, Affymetrix™) que degrada el DNA monocatenario subproducto de PCR, y SAP

(Fosfatasa alcalina de gamba) (USB<sup>®</sup>, Affymetrix<sup>™</sup>) que hidroliza el exceso dNTPs no incorporados al producto de PCR

En una nueva placa de 96 pocillos o microtubos de 0,2 mL (dependiendo del número de muestras a procesar) se dispensó el producto de PCR y la mezcla enzimática diluida (1/4) (Tabla 3.4.) ( $V_F = 7 \mu\text{L}$ ).

**Tabla 3.4.: Estequiometría para la purificación del producto de PCR de los amplicones del gen GLA.**

REACTIVO	CANTIDAD ( $\mu\text{l}$ )	CONC. FINAL
ddH <sub>2</sub> O libe DNAasa/RNasa	1,725	
SAP 1 UI/ $\mu\text{L}$ , USB <sup>®</sup>	0,25	0,25 UI
Exo I 10 UI/ $\mu\text{L}$ , USB <sup>®</sup>	0,025	0,25 UI

Los volúmenes anteriores están referidos para 1 Purificación de 1 amplicón

Las muestras se incubaron en un termociclador GeneAmp<sup>®</sup> 2720 PCR System a 37°C durante 30 minutos seguido de una etapa de inactivación enzimática de 80°C durante 15 minutos y se mantuvo a 4°C.

El producto purificado se conservó, bien a 4°C para su uso inmediato, bien a -20°C para su estudios posteriores.

### 3.9.3. Reacción de secuenciación de Sanger combinada con electroforesis capilar. Análisis de secuencias

Para la secuenciación tipo Sanger, basada en dideoxinucleótidos trifosfato (ddNTPs) terminadores marcados con un fluorocromo, se utilizó la batería de reactivos Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems<sup>®</sup>, Life technologies<sup>™</sup>), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para la reacción se utilizaron placas de 96 pocillos (Labcon) apropiadas para el secuenciador ABI-3500 XL Genetic Analyzer for Resequencing and Fragment Analysis (Applied Biosystems<sup>®</sup>, Life technologies<sup>™</sup>) selladas con una lámina de aluminio (Thermo Scientific) asegurándonos evitar pérdidas por evaporación.

La reacción tuvo lugar en un termociclador GeneAmp<sup>®</sup> 2720 PCR System siguiendo el programa térmico especificado por el fabricante.

Una vez finalizada la reacción se procedió con la purificación del producto de secuenciación mediante un protocolo de precipitación alcohólica ligeramente diferente del propuesto por el fabricante. A cada pocillo se le añadió 4 µL de una disolución de EDTA 62,5 mM pH = 8 en agua desionizada estéril y 60 µL de un mezcla de precipitación alcohólica mantenida en un baño de hielo (Tabla 3.5.). Se selló la placa con la lámina de aluminio y se homogeneizó suavemente por inversión 10 veces, se centrifugó brevemente a 900 x r.p.m. durante 30 segundos a 4°C Allegra™ 25R (Beckman Coulter®) y se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos protegida de la luz. Finalizada la incubación se centrifugó a 2900 x r.p.m durante 30 minutos a 4°C. Pasado ese tiempo se cubrió el fondo del cestillo de la centrífuga con papel secamanos absorbente, se quitó la lámina de aluminio, se volteó con cuidado la placa y se centrifugó de nuevo la placa (esta vez invertida) a 900 x r.p.m durante 1 minuto a 4°C. Seguidamente se añadió a cada pocillo 70 µL de etanol 70 % (p/v) (Panreac), se selló de nuevo la placa con la lámina de aluminio y se sometió a una nueva centrifugación 2900 x r.p.m durante 15 minutos a 4°C. Pasado ese tiempo se cubrió de nuevo el fondo del cestillo de la centrífuga con papel secamanos absorbente, se quitó la lámina de aluminio, se volteó con cuidado la placa y se centrifugó la placa (esta vez invertida) a 900 x r.p.m durante 1 minuto a 4°C.

**Tabla 3.5.: Estequiometría para la purificación del producto de secuenciación (cantidades mostradas por cada muestra).**

REACTIVO	CANTIDAD (µl)
Etanol 96% (p/v), Panreac™ (calidad PA)	67,7
ddH <sub>2</sub> O libre DNAasa/RNAasa	7,8
Acetato de sodio 3 M pH = 5,2, Sigma – Aldrich®	2,6

Los volúmenes anteriores están referidos para 1 Purificación de 1 Producto Sanger

Finalizado este proceso, bien se congeló el precipitado a -20°C protegido de la luz hasta 7 días (estudio posterior), bien se procedió con la desnaturalización de ese precipitado. Si se procedía con la desnaturalización de los precipitados, éstos se resuspendieron con 20 µL Formamida (Hi-Di Formamide™) (Applied

Biosystems<sup>®</sup>, Life technologies<sup>™</sup>) para después someterlos a desnaturalización en un termociclador GeneAmp<sup>®</sup> 2720 PCR System a 95 °C durante 2 minutos y se mantuvo a 4°C.

La electroforesis capilar se llevó a cabo en el secuenciador ABI-3500 XL Genetic Analyzer for Resequencing and Fragment Analysis, ubicado en el Servicio de Secuenciación y Genómica Funcional en el edificio del Centro de Investigaciones Biomédicas de Aragón (CIBA).

Para la normalización, alineamiento automático y análisis de las secuencias obtenidas, se empleó el software Variant Reporter v1.1. (Applied Biosystems<sup>®</sup>, Life technologies<sup>™</sup>).

La nomenclatura de las variantes identificadas se realizó acorde a las recomendaciones de la Sociedad para la Variación del Genoma Humano (HGVS) (ver enlaces) tomando la secuencia codificante NM\_000169.2 depositada en la base de datos GenBank como referencia.

La identificación de alguna variante desconocida o patológica en los amplicones estudiados del gen *GLA* requirió posterior confirmación, volviendo a resecuenciar ese amplicón o por análisis de Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP's), siempre y cuando fuese factible este último.

#### 3.9.4. Análisis de restricción. Identificación de variantes en el gen *GLA*

Para confirmar algunas de las variantes desconocidas o patológicas identificadas (véase el apartado 3.9.3. de este mismo capítulo), se realizó análisis de RFLP del amplicón que contenía la variante.

Se llevó a cabo PCR del amplicón específico y visualización de éste por electroforesis en gel de agarosa al 2% (p/v) según lo especificado en el apartado 3.9.1.

La digestión del producto de PCR se realizó con la enzima de restricción, apropiada para el análisis de cada variante, siguiendo la recomendación del fabricante de cada una de las enzimas utilizadas: Msp I (Gibco<sup>®</sup>/Life technologies<sup>™</sup>), Sac II (Takara Bio INC), SfaN I (Amersham Pharmacia Biotech/GE Healthcare<sup>™</sup>).

El producto de digestión se sometió a electroforesis durante 45 minutos a 90V en gel de agarosa de alta resolución NuSieve™GTG™ (Lonza) al 3% (p/v) preparada con TAE 1x que contenía 0,5 µg/mL de Bromuro de Etidio. En cada pocillo se añadieron 8 µL de producto de PCR y 8 µL de tampón de carga (azul de bromofenol), también se cargó 2 µL de marcador de bajo PM “Low DNA Mass Ladder”.

El producto de digestión se visualizó, revelando el gel en el transiluminador Gel Doc™ 2000 determinado los tamaños de los fragmentos generados en cada amplicón, mediante el software Multi-Analyst® v1.0. El genotipo para cada variante se estableció comparando el patrón de pesos de moleculares de los fragmentos teórico, obtenido bioinformáticamente con la herramienta RestrictionMapper (ver enlaces), con el patrón de pesos moleculares de los fragmentos en la muestra. En estos análisis se incluyó un control positivo hemizigoto u homocigoto para el alelo salvaje, ya que se carecen de controles positivos heterocigotos para los alelos analizados.

### **3.10. Análisis “in silico” de las variantes en zona promotora**

Para comprobar el hipotético efecto de variantes desconocidas, en zona promotora, sobre la regulación de la expresión génica; se utilizó la herramienta bioinformática MatInspector (Genomatix) (ver enlaces) que informa de la unión de una secuencia problema a las matrices de factores de transcripción generados bioinformáticamente a partir de una base datos.

Comparamos la secuencia de referencia con la secuencia que contenía la variante, analizando el cambio en los perfiles de unión o pérdida de unión de factores de transcripción en la zona circundante a esa variante.

### **3.11. Análisis de variantes de ajuste “splicing” alternativo**

Para comprobar que algunas de las variantes encontradas en el análisis molecular del gen *GLA* pudieran alterar el normal mecanismo normal de ajuste “splicing” del pre-mRNA, se realizaron las siguientes determinaciones sobre la molécula complementaria (cDNA) al mRNA del gen *GLA*.

### 3.11.1. Análisis “in silico de las variantes de ajuste alternativo

Se utilizaron 2 herramientas bioinformáticas (MutationTaster y Splice Site Prediction Program by Neural Network) para evaluar si nuestras variantes encontradas podían resultar ser patogénicas, si estaban implicadas en creación de nuevos sitios de ajuste o bien en destrucción de sitios de ajuste conservados etc.

MutationTaster (ver enlaces) se trata de un predictor de patogenicidad, analizando por procesos estadísticos, el efecto de la variante en los sitios de ajuste, secuencia aminoacídica etc. Splice Site Prediction Program by Neural Network “SSPNN” (ver enlaces) analiza la fortaleza de las regiones de ajuste o circundantes a éstas (valor máximo 1) evaluando hipotéticas eliminaciones y/o generaciones de éstas.

### 3.11.2. Síntesis de cDNA total

Para la retrotranscripción de todo el mRNA a partir del RNA total aislado, se tomó 1 µg de RNA total y se llevó un  $V_F$  de 20 µL. Se utilizó la batería de reactivos PrimeScript™ 1st strand cDNA Synthesis Kit (Takara Bio INC.), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Toda la manipulación del RNA total se llevó a cabo en baño de hielo y en campana de flujo laminar, además de uso de material exclusivo para RNA.

En un primer paso se llevó a cabo la hibridación de OligodT a las colas poliA del mRNA presente en el RNA total aislado; para este paso se adicionó a 1 µg de RNA total, una mezcla de reacción ( $V_F$  reacción = 10 µL) que contiene por cada muestra: 1 µL de OligodT Primer 50 µM, 1 µL de dNTP mixture (10mM de cada dNTP) y cantidad suficiente (c.s.p.) de ddH<sub>2</sub>O para volumen final de 10 µL. Se incubó en un termociclador GeneAmp® 9700 PCR System a 65°C durante 10 minutos y después se mantuvo a 4°C.

En un segundo lugar se llevó a cabo la Retrotranscripción “RT-PCR”, en la que por cada molécula de mRNA que haya hibridado la cola OligodT, se generará una molécula de cDNA (relación 1:1). Al producto de hibridación anterior se le añadió una mezcla de RT-PCR ( $V_F$  reacción = 10 µL) que contenía por cada muestra: 5 µL de PrimeScript Buffer 5 x, 0,5 µL de RNAase inhibitor (40 UI/µL),

1  $\mu\text{L}$  de PrimeScript RTases (200UI/ $\mu\text{L}$ ) y c.s.p. de ddH<sub>2</sub>O para 10  $\mu\text{L}$ . Se incubó en un termociclador GeneAmp<sup>®</sup> 9700 PCR System a 42 °C 60 minutos, seguido de 95°C 5 minutos y después se mantuvo a 4°C.

Finalizado este proceso, el producto de RT-PCR se conservó, bien a 4°C para su uso inmediato, bien a -20°C para estudios posteriores.

### 3.11.3. Control de calidad de RT-PCR

Mediante PCR específica de un fragmento del gen constitutivo *ACTB*, codificante para  $\beta$ -Actina, y utilizando como molde el cDNA obtenido anteriormente, se pudo comprobar la calidad de éste para estudios posteriores (12).

El diseño de los cebadores específicos para el fragmento del gen *ACTB* se refleja en la Tabla 3.6.

**Tabla 3.6.: Cebadores específicos para la amplificación de un fragmento del cDNA correspondiente al mRNA del gen *ACTB*.**

CEBADOR	5'-SECUENCIA-3'	Ta	AMPLICÓN
Beta Actina D	ACACTGTGCCCATCTACGAGG	50°C	621 pb
Beta Actina R	AGGGGCCGGACTCGTCATACT		

.Ta= temperatura de "annealing"

La PCR se llevó a cabo en microtubos de 0,2 mL incorporando todos los reactivos y el cDNA (Tabla 3.7.) ( $V_F$  reacción = 10  $\mu\text{L}$ ).

La reacción se llevó a cabo en un termociclador GeneAmp<sup>®</sup> 9700 PCR System según el programa térmico 94 2' / 35 x (94°C 30" 60°C 30" 72°C 30") / 72°C 4' / 4°C mantenimiento

El producto final de PCR se sometió a una electroforesis durante 30 minutos a 90V en un gel de agarosa al 2% (p/v) preparada con TAE 1x que contenía 0,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de Bromuro de Etidio. En cada pocillo se añadieron 2  $\mu\text{L}$  de producto de PCR y 2  $\mu\text{L}$  de tampón de carga (azul de bromofenol), también se añadió 1  $\mu\text{L}$  de marcador de bajo PM "Low DNA Mass Ladder".

El producto de PCR se visualizó, revelando el gel en el tansiluminador Gel Doc™ 2000, determinado el tamaño de banda específico del amplicón mediante el software Multi-Analyst® v1.0.

**Tabla 3.7.: Estequeometría para la amplificación por PCR de un fragmento del cDNA correspondiente al mRNA del gen *ACTB*.**

REACTIVO	CANTIDAD (µl)	CONC. FINAL
ddH <sub>2</sub> O libre DNAasa/RNAsa	6,3	
Tampón 10 x, Biorline®	1	1x
dNTPs (2mM), Invitrogen®	1	200 µM
Mg <sub>2</sub> Cl (50mM), Biorline®	0,3	1,5 mM
Cebador Directo (10 µM)	0,2	200 nM
Cebador Reverso (10 µM)	0,2	200 nM
BIOTAQ™ DNA polimerasa 5 UI/µL, Biorline®	0,06	0,75 UI
cDNA	1	

Los volúmenes anteriores están referidos para 1 PCR de 1 amplicón

#### 3.11.4. Amplificación de cDNA específico de gen *GLA*

Para poder estudiar el efecto de las variantes sobre el hipotético ajuste alternativo, fue necesario obtener una cantidad razonable de cDNA específico de gen *GLA* (12).

El diseño de los cebadores específicos para el cDNA correspondiente al mRNA específico del gen *GLA* se refleja en la Tabla 3.8.

**Tabla 3.8.: Cebadores específico para la amplificación del cDNA correspondiente al mRNA del gen *GLA*.**

CEBADOR	5'-SECUENCIA-3'	Ta	PRODUCTO
GLA20 D	TGCAGCTGAGGAACCCAGAACTACA	59°C	1114 pb
GLA1113R	AGGGAAGCAACTGCGATGGTA		

Ta= temperatura de "annealing"

La PCR se realizó utilizando en placas de 96 pocillos precortadas en las que se incorporaron todos los reactivos y el cDNA (Tabla 3.9). (V<sub>F</sub> reacción = 50 µL)

**Tabla 3.9.: Estequiometría para la amplificación por PCR del cDNA correspondiente al mRNA del gen *GLA*.**

REACTIVO	CANTIDAD (μl)	CONC. FINAL
ddH <sub>2</sub> O libre DNAasa/RNAsa	34,5	
Tampón 10 x, Boline®	5	1x
dNTPs (2mM), Invitrogen®	5	200 μM
Mg <sub>2</sub> Cl (50mM), Boline®	1,5	1,5 mM
Cebador Directo (10 μM)	1	200 nM
Cebador Reverso (10 μM)	1	200 nM
BIOTAQ™ DNA polimerasa 5 UI/μL, Boline®	0,85	0,75 UI
cDNA	1	

Los volúmenes anteriores están referidos para 1 PCR de 1 amplicón

La reacción se llevó a cabo en un termociclador GeneAmp® 9700 PCR System según el programa térmico 94 2' / 35 x (94°C 30" 59°C 30" 72°C 30") / 72°C 4' / 4°C y mantenimiento.

El producto de PCR se conservó a -20°C para caracterizaciones posteriores.

### 3.11.5. Caracterización electroforética de fragmentos de cDNA específico de gen *GLA* en geles de poliacrilamida

Para comprobar un hipotético ajuste alternativo, analizamos el posible grupo de transcritos generados de diversos tamaños, siendo capaces de caracterizarlos mediante geles de poliacrilamida (PAA).

Para la preparación de geles de poliacrilamida al 6% se añadieron los siguientes reactivos en orden (Tabla 3.10), sin dejar de homogeneizarse y en campana extractora: agua desionizada estéril, Acrilamida/BisAcrilamida 30%(p/v) (37,5:1) (Bio-Rad), TBE 10x (Tris-Ácido Bórico 0,89 M EDTA 0,5 M pH = 8,0) (Carlo Erba), Persulfato amónico (APS) 10% (p/v) (Bio-Rad) disuelto en agua desionizada, N,N,N,N'-tetrametilendiamina (TEMED) 0,1 % (Bio-Rad).

**Tabla 3.10.: Reactivos para polimerización de PAA al 6%.**

REACTIVO	CANTIDAD (mL)
dH <sub>2</sub> O estéril	34,5
Acrilamida/BisAcrilamida 30% (37,5:1)	14,6
TBE 10x	5,5
APS 10 %	0,3
TEMED 0,1 %	0,03

Volúmenes de reactivos para 1 gel de 55 mL.

Una vez polimerizado el gel se sumergió en una célula de electroforesis vertical Protean<sup>®</sup> II xi Cell (Bio-Rad) con TBE 1x como tampón de electroforesis. Se cargó en cada uno de los pocillos una mezcla de 15 µL del producto de cDNA específico de gen *GLA* (véase apartado 3.11.4. de este mismo capítulo) y 5 µL de tampón de carga (Xylene Cyanol). Se conectó a la fuente de alimentación y se sometió un proceso de electroforesis durante 3 horas a 46 mA.

Finalizado el proceso de electroforesis se sumergió el gel en una mezcla de 500 mL de tampón TBE 1x (diluido en agua desionizada) con 1mL de disolución de Bromuro de Etidio (0,5 µg/mL), y se dejó teñir durante 20 minutos con agitación por balanceo dentro de campana extractora.

El resultado se visualizó revelando el gel en el tansiluminador Gel Doc<sup>™</sup> 2000, comparando el patrón de bandas de los pacientes con el patrón de bandas de individuos sanos control, mediante análisis con el software Multi-Analyst<sup>®</sup> v1.0 (Bio-Rad).

### **3.12. Análisis estadístico**

El análisis estadístico se desarrolló con el programa informático IBM SPSS Statistics 18.0 (IBM<sup>®</sup>) tomando como nivel significativo estadístico los valores de  $p \leq 0,05$ .

*Los test no paramétricos empleados para estudiar nuestra muestra fueron la prueba de Mann-Whitney y de Kolmogorov-Smirnov.*

Las pruebas empleadas para los estudios de comparación de variables ordinales en nuestra muestra fueron Chi-cuadrado de Pearson, Chi-cuadrado de Pearson con corrección por continuidad y el Estadístico exacto de Fisher.

El análisis de la asociación de las variantes nucleotídicas se realizó mediante tablas de contingencia y pruebas de contraste de hipótesis comparando, por sexos, las frecuencias alélicas y genotípicas de cada una de las variantes de nuestra muestra respecto a las mismas en una población control.

Como población control se recurrió a datos de frecuencias alélicas y genotípicas de nuestras variantes de interés en población Europea, recogidas en bases de datos de grandes proyectos de secuenciación: Proyecto 1000 Genomas y Proyecto de Secuenciación de Exomas (ESP) del Instituto nacional para el corazón, pulmón y la sangre (NHLIB) de Estados Unidos (ver enlaces)

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Características de la muestra de estudio

Finalizado el período de reclutamiento, el número de pacientes de los que se obtuvieron muestras viables para el diagnóstico bioquímico y genético, quedó establecido en 374 y 73 controles.

Consideramos los principales índices descriptivos de nuestra muestra la edad y IMC de los centros participantes (Tabla 4.1).

Tabla 4.1.: Características de los pacientes con MHVI distribuidos por centros participantes.

CENTRO	MUJERES	VARONES	TOTAL
<b>H. G.U. de Alicante</b>			
Edad (años)	67±15	59±17	61,6±16,90
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	32,6± 6,36	28,6±4,00	30,1±5,24
n	22	54	76
<b>H. U. Puerta de Hierro</b>			
Edad (años)	53±3	53±3	53±3
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	26,5±6,20	27,5±4,53	27,11±5,24
n	26	45	71
<b>C. H. U. Santiago de Compostela</b>			
Edad (años)	58	59	59±1
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	-	21,22	21,2±1,00
n	1	1	2
<b>Universidad de Murcia</b>			
Edad (años)	64±3	64±3	64±3
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	29,1±5,80	29,4±4,55	29,3±4,99
n	32	60	92

Tabla 4.1. Continuación.

CENTRO	MUJERES	VARONES	TOTAL
<b>H. U. Virgen de la Arrixaca</b>			
Edad (años)	70±1	71±1	71±1
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	27,1±3,93	29±4,47	28,4±4,32
n	11	25	36
<b>H. Son Llatzer</b>			
Edad (años)	76±1	75±2	75±2
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	30,4	28,9±3,69	29,2±3,27
n	15	27	42
<b>H. U. G. de Elche</b>			
Edad (años)	79	79±1	79±1
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	-	-	-
n	6	14	20
<b>H. U. de Donostia</b>			
Edad (años)	85±3	84±3	84±3
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	26,7±3,22	26,9±2,41	28,9±2,71
n	12	24	36

Los datos se expresan como valor medio ± desviación estándar. n = nº pacientes. IMC: índice de masa corporal.

La contribución de cada uno de los centros al estudio no fue equitativa como se refleja en la tabla anterior.

El análisis estadístico con las pruebas no paramétricas de Mann-Whitney y Kolmogorov-Smirnov no mostró diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) en el conjunto de pacientes de la muestra ni en la distribución de pacientes por centro de procedencia. Se comparó la edad de los pacientes con la distribución de éstos por sexos y el IMC de los pacientes con la distribución de éstos por sexos.

## 4.2. Valoración del estudio ecocardiográfico

Se recogieron datos del grosor de la pared del ventrículo izquierdo en la totalidad de los pacientes, y del tipo de afectación estructural del ventrículo izquierdo en 224 de los 375 pacientes.

Para comprender de qué manera se distribuyeron los tipos de alteración estructural de la pared del ventrículo izquierdo en nuestra muestra (véase apartado 1.4.3. de Introducción), tratamos de comparar tipos en todos los centros con su asociación al sexo de los paciente de los mismos. (Tabla 4.2.) (Figura 4.1.).

El análisis estadístico con la prueba de Chi-cuadrado de Pearson no mostró asociación estadística ( $p=0,83$ ) entre el tipo de MHVI y el sexo de los pacientes.

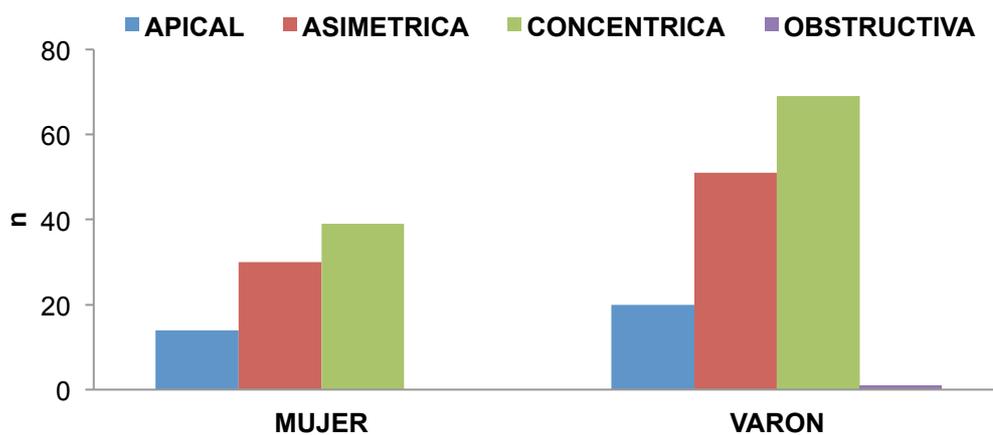
Tabla 4.2.: Descripción de los tipos de MHVI según sexos.

TIPO DE MHVI	MUJERES		VARONES		TOTAL	
	n	%	n	%	n	%
Apical	14	11,2	20	8	34	15,2
Asimétrica	30	24	51	20,4	81	36,2
Concéntrica	39	31	69	27,6	108	48,2
Obstruktiva	0	0	1	0,4	1	0,4
Total	83	37	141	63	224	

n = nº de pacientes

El tipo de MHVI más frecuente en nuestra muestra es el concéntrico (48,2%), coincidiendo con el tipo de MHVI más común en la afectación cardíaca asociada a la EF (1).

Figura 4.1.: Distribución de Tipos de MHVI según sexos.



n = número de pacientes

### 4.3. Cribado enzimático en DBS sobre tarjeta FTA

Se recogieron valores de actividad enzimática en DBS sobre tarjeta FTA de 355 de los 375 pacientes.

Se determinó la actividad enzimática de  $\alpha$ -Gal A (véase apartado 3.8.1. de Materiales y Metodología) en los pacientes de cada uno de los centros.

En la Tabla 4.3. se especifica los porcentajes medios de actividad enzimática de los pacientes, como cálculo del porcentaje de actividad enzimática vs actividad enzimática media del grupo de individuos control de su mismo centro y de su mismo sexo. Esta medida de normalización de valores de actividad enzimática nos permitió realizar los correspondientes análisis estadísticos.

El resultado del análisis estadístico con prueba de Mann-Whitney indicó que no existían diferencias estadísticas ( $p = 0,451$ ) entre ambos sexos en cuanto al porcentaje de actividad enzimática.

Tabla 4.3.: Valores de actividad enzimática de muestras DBS en tarjeta tipo FTA de pacientes.

CENTRO	MUJERES	VARONES	TOTAL
<b>H. G.U. de Alicante</b>			
% Actividad enzimática	81,4±21,49	94,7±39,55	90,7±35,53
n	22	52	74
<b>H. U. Puerta de Hierro</b>			
% Actividad enzimática	153,5±79,05	147,1±88,13	149,4±84,48
n	25	45	70
<b>C. H. U. Santiago de Compostela</b>			
% Actividad enzimática	-	298,1	298,10
n	-	1	1
<b>Universidad de Murcia</b>			
% Actividad enzimática	72,4±35,59	85±37,84	80,7±37,37
n	30	59	89
<b>H. U. Virgen de la Arrixaca</b>			
% Actividad enzimática	-	77,2±37,63	77,2±37,63
n	-	25	25
<b>H. Son Llatzer</b>			
% Actividad enzimática	104,6±52,49	107,6±61,39	106,5±57,76
n	14	26	40
<b>H. G. U. de Elche</b>			
% Actividad enzimática	106,5±41,74	109,4±52,90	108,5±48,73
n	6	14	20
<b>H. de Donostia</b>			
% Actividad enzimática	117,4±43,50	134,4±46,79	128,7±45,81
n	12	24	36

Los datos de pacientes se expresan como valor medio del porcentaje (%) de actividad enzimática ± desviación estándar. n = nº pacientes.

Como criterio de corte, se estableció un valor elevado de actividad enzimática en comparación con otros estudios realizados previamente de cribado enzimático para la EF(2,3). Así pues, cuando el valor de porcentaje de actividad enzimática fuese < 70%, implicaba que el paciente en cuestión no

podía ser descartado como afecto/portador de la EF y por tanto se debía continuar el diagnóstico con el análisis molecular del gen *GLA*.

Mención especial merecen las mujeres, ya que el valor de actividad enzimática no es informativo de su estatus para la EF como ha sido demostrado previamente (4,5), ni permite su correcto cribado. La totalidad de las muestras procedentes de mujeres, tras la determinación enzimática, requirieron análisis molecular del gen *GLA* para comprobar su estatus respecto a la EF.

El resultado de porcentaje de actividad enzimática en DBS, individualizado para cada sexo, se recoge en la Tabla 4.4.

**Tabla 4.4.: Resultados del cribado enzimático de muestra de DBS en tarjeta tipo FTA, según sexos.**

PORCENTAJE	MUJERES		VARONES		TOTAL	
	n	%	n	%	n	%
A <sub>Er</sub> ≤ 70%	46	12,8	65	18,1	111	30,9
A <sub>Er</sub> > 70%	65	18,1	183	51	248	69,1
Total	111	30,9	248	69,1	359	

n = nº de pacientes analizados. A<sub>Er</sub>: Porcentaje del valor actividad enzimática del paciente vs actividad enzimática de los controles de su mismo sexo y centro. Nota: datos en mujeres son informativos, no permiten realizar su cribado por determinación de actividad enzimática exclusivamente.

Los pacientes 041 y 042 (varones) del H. U. Puerta de Hierro presentaron un valor de actividad enzimática relativa de 22 y 0 % respectivamente tras 3 determinaciones independientes, por lo que al mismo tiempo que procedíamos a su resecuenciación solicitamos muestras de sangre periférica para obtener muestras de plasma y concentrado de leucocitos para determinar los niveles de actividad enzimática en ellas (véase apartados 3.7.2 y 3.7.3. de Materiales y Metodología) y confirmar el primer resultado.

- Paciente 041: Desgraciadamente no recibimos muestras complementarias, pero en el resultado de la resecuenciación no se identificaban variantes patológicas ni polimórficas. Su estatus para la EF no pudo ser confirmado ya que la resecuenciación no detecta grandes

reordenamientos en el gen *GLA* que podrían explicar los niveles de actividad enzimática determinados en DBS.

- Paciente 042: Se recibieron muestras muestras complementarias y se determinaron valores de actividad enzimática en plasma de 15,5 nmol/mL plasma/h (65% respecto a la media de nuestros controles) y en extracto celular de leucocitos de 47,75 nmol/mg prot./h (94,37% respecto a la media de los controles) considerando al paciente, por los resultados anteriores y su condición de varón, como no compatible para la EF. Este resultado fue refrendado por el resultado de la resecuenciación, no identificándose variantes patológicas ni polimórficas.

En el caso de estos pacientes podemos concluir que pudieron ocurrir defectos graves al preparar la muestra, en su conservación o en su envío etc. Afectando al resultado de actividad enzimática de DBS.

Las limitaciones de nuestro estudio, fueron entre otras, la toma de muestras realizadas en los distintos centros (como se demostró en el caso de los pacientes anteriormente comentados) ya que existía una variabilidad considerable en el volumen de muestra depositada sobre el filtro de la tarjeta. Intentando unificar criterios entre todos los centros participantes, respecto al llenado de las áreas de la tarjeta tipo FTA, desde nuestro laboratorio se repitieron las directrices correctas de llenado las áreas ( $V = 35 \mu\text{L}$  de sangre) asegurando así reducir el número de falsos positivos o negativos en cuanto al cribado de varones

Otras limitaciones de menor importancia, pero con repercusión en a la hora de la determinación enzimática, fue la conservación de la tarjeta en el centro de procedencia y el tiempo transcurrido desde la deposición de la muestra en la tarjeta hasta la llegada a nuestro laboratorio etc.(6,7).

A pesar de las esfuerzos de nuestro laboratorio por intentar reducir la variabilidad, debido a la toma de muestras, se decidió solicitar a cada uno de los centros sus propios individuos control (véase el apartado 3.1. de Materiales y Metodología) para establecer un porcentaje de actividad enzimática.

#### 4.4. Análisis genético y descripción de variantes nucleotídicas identificadas

Teniendo en cuenta los resultados de actividades enzimáticas en DBS y el criterio de cribado, se resecuenció el gen *GLA* (véase apartado 3.9.4. de Materiales y Metodología) en un total de n = 65 varones cuya actividad enzimática en DBS fue inferior al 70% de la de los controles correspondientes a su sexo y centro de procedencia; por otra parte resecuenciamos el gen *GLA* en la totalidad de las mujeres (n = 111).

Resecuenciados cada uno de los exones, nexos de unión exón-intrón y zona promotora del gen *GLA* y comparados con la secuencia de referencia, se identificaron un total 17 variantes nucleotídicas (Tabla 4.5.), con implicaciones diversas en la estructura y regulación del gen *GLA*

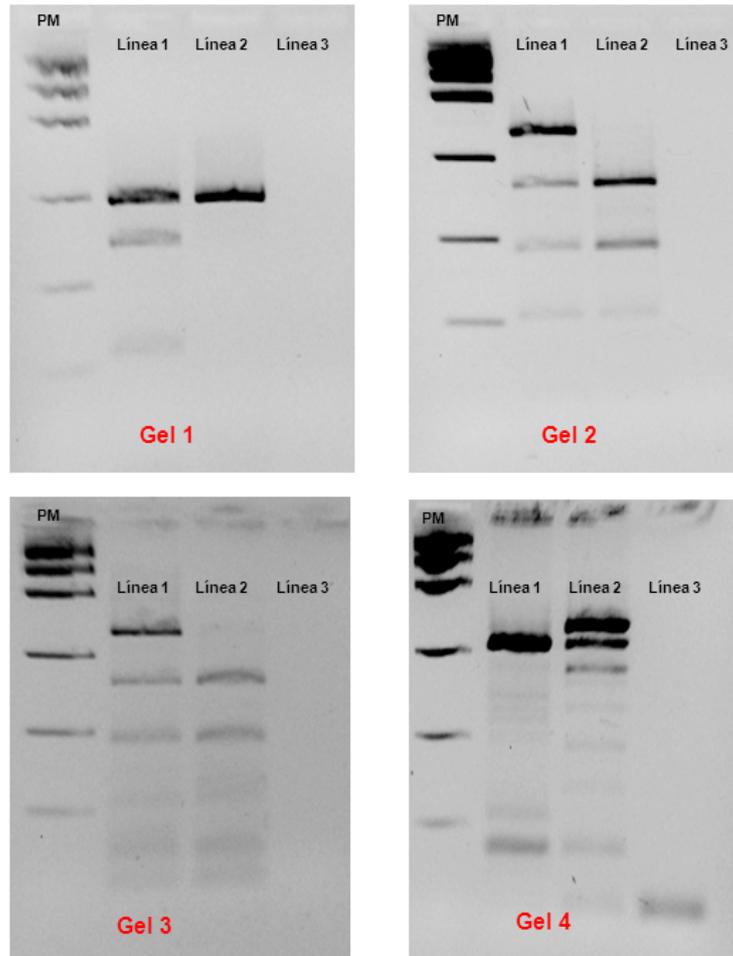
**Tabla 4.5.: Variantes nucleotídicas encontradas por resecuenciación del gen *GLA*.**

LOCALIZACIÓN	VARIANTE*	SNP	CAMBIO DE AMINOÁCIDO
PROMOTOR	c.-125 t>g	rs185255090	-
PROMOTOR	c.-105 a>g	rs3027583	-
PROMOTOR	c.-34 c>t	NA	-
PROMOTOR	c.-30 g>a	rs3027584	-
PROMOTOR	c.-12 g>a	rs3027585	-
PROMOTOR	c.-10 c>t	rs2071225	-
EXÓN 1	c.192 C>T (p.I64=)	NA	No se produce
INTRÓN 1	c.194+17 A>G	rs2071226	-
INTRÓN 2	c.376-81_77delCAGCC	rs201869175	-
EXÓN 3	c.376 A>G (p.S126G)	rs149391489	Serina > Glicina
INTRÓN 3	c.548-125 C>G	rs2071396	-
INTRÓN 4	c.639+68 A>G	rs3027589	-
INTRÓN 4	c.640-25 A>G	NA	-
INTRÓN 4	c.640-16 A>G	rs2071397	-
EXÓN 6	c.937 G>T (p.D313Y)	rs28935490	Aspartato > Tirosina
EXÓN 6	c.945 C>T (p.D315=)	rs151208856	No se produce
INTRÓN 6	c.1000-22 C>T	rs2071228	-

\*Notación según recomendación de HGVS (véase el apartado 3.11.3.). NA: No Asignado

La confirmación, de la identificación de estas variantes se obtuvo mediante nueva reacción de PCR, purificación de ésta y nueva resecuenciación (véanse los apartados 3.9.1. a 3.9.3. de Materiales y Metodología) o bien mediante análisis de restricción (véase el apartado 3.9.4. de Materiales y Metodología) cuyo resultado se ilustra en la Figura 4.2.

**Figura 4.2.: Electroforésis en gel al 3% de agarosa de alta resolución para identificación de variantes en el gen *GLA* mediante RFLP'S.**



**Gel 1:** identificación de **c.-125 t>g** con **MspI**. Línea 1 Marcador de peso molecular (PM) <2000 pb; Línea 2 Heterozigoto (tg); Línea 3 Control homozigoto (tt); Línea 4 Control negativo.

**Gel 2:** identificación de **c.-34 c>t** con **SacII**. Línea 1 Marcador de peso molecular (PM) <2000 pb; Línea 2 Heterozigoto (ct); Línea 3 Control homozigoto (cc); Línea 4 Control negativo .

**Gel 3:** identificación de **c.-30 g>a** con **SacII**. Línea 1 Marcador de peso molecular (PM) <2000 pb; Línea 2 Heterozigoto (ga); Línea 3 Control homozigoto (gg); Línea 4 Control negativo.

**Gel 4:** identificación de **c.-192 C>T (p.I64=)** con **SfaNI**. Línea 1 Marcador de peso molecular (PM) <2000 pb; Línea 2 Heterozigoto (CT); Línea 3 Control homozigoto (CC); Línea 4 Control negativo.

#### 4.4.1. Descripción de variantes nucleotídicas identificadas

La variante correspondiente al cambio c.376 A>G (p.S126G), identificada en hemizigosis en un paciente varón de 39 años, ha sido descrita con anterioridad en series clínicas de cribado de la EF relacionadas con afectación renal e Ictus (8,9), por lo que la consideramos variante de carácter patológico y compatible con la EF.

Identificamos una serie de variantes nuevas, no descritas previamente:

- La variante en zona promotora **c.-34 c>t** fue identificada en heterozigosis en una paciente mujer de 55 años. Esta variante se localizó en un dominio CpG sujeto a regulación epigenética (10-12) y podría comprometer la regulación de la expresión génica tipo Trans por factores de transcripción, por lo que realizamos un análisis bioinformático de la región circundante en busca de alteraciones (véase el apartado 3.10. de Materiales y Metodología) del patrón normal de unión de factores de transcripción (véase el apartado 4.5.1. de este mismo capítulo) como primera aproximación para caracterizar la variante.
- La variante **c.192 C>T (p.I64=)** fue identificada en heterozigosis en una mujer de 82 años. Esta variante genera una mutación silente en la secuencia aminoacídica, sin embargo el cambio se encuentra a 2 pb del extremo 3' del exón 1 del gen *GLA* y por tanto cerca de la junta donora de ajuste "splicing". Esta variante podría comprometer el patrón normal de procesamiento del pre-mRNA del gen *GLA* generando un transcrito no fisiológico que acabaría siendo degradado. El resultado del predictor de patogenicidad MutationTaster (véase apartado 3.11.1. de Materiales y Metodología) indicó una probabilidad de considerar la variante como patológica de 1 sobre 1. El resultado de la herramienta SPNSS mostró una pérdida completa de fortaleza en el sitio donor de ajuste pasando de 0,94 sobre 1 a desaparecer. En base a estas evidencias se siguió caracterizando la variante como mostraremos en el apartado 4.5.3 de este mismo capítulo.

- La variante **c.640-25 A>G** fue identificada en heterocigosis en una mujer de 72 años. La variante se localiza en el Intrón 4, a 23pb de la secuencia aceptora conservada de ajuste normal del exón 3 y exón 4. El resultado del predictor de patogenicidad MutationTaster indicó una probabilidad de considerar la variante como polimórfica de 0,999 sobre 1; teniendo en cuenta este hecho la clasificamos como no causal de enfermedad, finalizando así su caracterización.

Se identifican una serie de variantes, que aunque recogidas como polimórficas en la base de datos dbSNP (ver enlaces), su contribución al fenotipo de la EF está en entredicho por los diferentes grupos de trabajo (véase apartado 1.3.1 de Introducción). Entre ellas destacan el cambio c.-30 a>g que produce un incremento de los niveles en plasma de la enzima, por desregulación de su expresión (13,14), y el cambio c.937 G>T (p.D313Y) que genera un alelo de pseudodeficiencia (15-17). Ambas variantes alteran la actividad catalítica de la enzima (una por incremento de expresión, la otra por reducción del 25 % de la actividad intracelular) pero no existe un criterio unificado respecto a su carácter patogénico en el desarrollo de la EF.

El resto de variantes que se identificaron, se recogían como variantes polimórficas en la base de datos dbSNP (ver enlaces).

Finalmente se observó que determinados pacientes presentaban una serie de variantes en zonas no codificantes, que están asociadas entre sí, y que ocurren en patrones haplotípicos que referiremos en adelante como Haplotipos Complejos Intrónicos (HCI). En algunos pacientes no solo se observó un solo tipo de HCI, si no una combinación de dos. Mediante la ampliación de regiones de resecuenciación se pudo afirmar que el HCI Tipo III está caracterizado por 4 variantes y no por 3 como indicaban estudios previos (18). El estudio y caracterización de estos haplotipos se desarrollará en el apartado 4.6. de este mismo capítulo.

#### 4.4.2. Análisis de asociación de las variantes identificadas y la EF.

En los estudios de asociación de alelos y genotipos ligados al sexo, las mujeres presentan 3 genotipos posibles (silvestre/silvestre, silvestre/mutado y mutado/mutado), pudiendo calcularse frecuencias genotípicas y frecuencias alélicas, comportándose como un alelo autosómico a la hora realizar el análisis. El caso de los varones es diferente, ya que al presentar sólo 2 genotipos posibles (silvestre y mutado) la frecuencia genotípica coincidirá con la alélica, variando la manera habitual de realizar el análisis.

El análisis de la asociación de las variantes recogidas en la Tabla 4.5. (véase apartado 4.4. de este mismo capítulo) sólo pudo llevarse a cabo en aquellas en las que existen datos de frecuencias alélicas y genotípicas en individuos control, por lo que las nuevas variantes identificadas por nuestro grupo( c.-34 c>t; c.192 C>T (p.I64=); c.640-25 A>G) quedan excluidas de este análisis.

La asociación genotípica y/o alélica de variantes, de pacientes con MHVI en nuestra muestra, con la EF se recoge en las Tablas 4.6. y 4.7.

El estudio de equilibrio poblacional (según Ley de Hardy-Weinberg) y de haplotipos no se ha realizado todavía.

Tabla 4.6.: Análisis de asociación genotípica y alélica en mujeres con MHVI y la EF.

VARIANTE	SNP	ASOCIACIÓN GENOTÍPICA	ASOCIACIÓN ALÉLICA
c.-125 t>g	rs185255090	0,383	0,383
c.-105 a>g	rs3027583	NC	NC
c.-30 g>a	rs3027584	0,577	0,576
c.-12 g>a	rs3027585	0,86	0,382
<b>c.-10 c&gt;t</b>	rs2071225	<b>0,057<sup>2*</sup></b>	<b>0,026<sup>2†</sup></b>
c.194+17 A>G	rs2071226	0,383	0,383
c.376-81_77delCAGCC	rs201869175	0,479	0,279
c.376 A>G (p.S126G)	rs149391489	0,904	0,904
<b>c.548-125 C&gt;G</b>	rs2071396	<b>0,039<sup>3†</sup></b>	<b>0,042<sup>3†</sup></b>
<b>c.639+68 A&gt;G</b>	rs3027589	<b>0,083<sup>3*</sup></b>	<b>0,087<sup>3*</sup></b>
c.640-16 A>G	rs2071397	0,860	0,787
<b>c.937 G&gt;T (p.D313Y)</b>	rs28935490	<b>0,033<sup>3†</sup></b>	<b>0,033<sup>3†</sup></b>
c.945 C>T (p.D315=)	rs151208856	NC	NC
c.1000-22 C>T	rs2071228	0,333	0,397

<sup>1</sup> Test de chi-Cuadrado; <sup>2</sup> Test de chi-Cuadrado con corrección por continuidad; <sup>3</sup> Estadístico Exacto de Fisher con significación exacta unilateral.; \* 0,1 < p < 0,05; † p < 0,05; ‡ p < 0,01. NC: no es posible calcularlo.

En el grupo de las mujeres parece haber una asociación estadísticamente significativa entre el genotipo GT (Odds Ratio = 2,222) y también entre el alelo G (Odds Ratio = 2,197), con el MHVI que padecen. Resulta llamativo el riesgo de padecer en mujeres MHVI con esta variante tan polémica en la EF.

Algunas de las variantes de los HCl Tipo I y Tipo III parecen tener una relación estadística con la MHVI en diferente grado de significación.

Sería interesante contar con datos de frecuencias alélicas y genotípicas de las variantes recogidas en la Tabla 4.5. (véase el apartado 4.5. de este mismo capítulo) en población de península ibérica para establecer estudios de asociación más homogéneos.

Tabla 4.7.: Análisis de asociación genotípica y alélica en varones con MHVI y la EF.

VARIANTE	SNP	ASOCIACIÓN GENOTÍPICA/ALÉLICA
c.-125 t>g	rs185255090	NC
c.-105 a>g	rs3027583	NC
c.-30 g>a	rs3027584	0,444
<b>c.-12 g&gt;a</b>	rs3027585	<b>0,008<sup>3‡</sup></b>
c.-10 c>t	rs2071225	0,282
c.194+17 A>G	rs2071226	NC
<b>c.376-81_77delCAGCC</b>	rs201869175	<b>0,068<sup>3*</sup></b>
c.376 A>G (p.S126G)	rs149391489	0,207
<b>c.548-125 C&gt;G</b>	rs2071396	<b>0,005<sup>3‡</sup></b>
<b>c.639+68 A&gt;G</b>	rs3027589	<b>0,018<sup>3†</sup></b>
c.640-16 A>G	rs2071397	0,844
c.937 G>T (p.D313Y)	rs28935490	NC
<b>c.945 C&gt;T (p.D315=)</b>	rs151208856	<b>0,089<sup>3*</sup></b>
<b>c.1000-22 C&gt;T</b>	rs2071228	<b>0,071<sup>3*</sup></b>

<sup>1</sup> Test de chi-Cuadrado; <sup>2</sup> Test de chi-Cuadrado con corrección por continuidad; <sup>3</sup> Estadístico Exacto de Fisher con significación exacta unilateral.; \* 0,1 < p < 0,05; † p < 0,05; ‡ p < 0,01. NC: no es posible calcularlo.

En el grupo de los varones parece haber una asociación estadística, en varios grados de significación, en todas las variantes del HCI Tipo III y la MHVI observada en ellos.

Al igual que en el grupo de las mujeres, sería interesante contar con datos de frecuencias alélicas y genotípicas de las variantes recogidas en la Tabla 4.5.(véase el apartado 4.5. de este mismo capítulo) en población de península ibérica para establecer estudios de asociación más homogéneos.

## 4.5. Caracterización de las nuevas variantes nucleotídica

### 4.5.1. Búsqueda de sitios de unión de factores de transcripción a la zona promotora circundante a la variante c.-34 c>t

El análisis realizado con MatInspector (véase apartado 3.13.1 de Materiales y Metodología) de la región circundante a la variante c.-34 c>t, comparando la variante silvestre con la variante alternativa, indicó la creación de un sitio potencial de unión al factor de transcripción (TF) E2F-myc cuando la región promotora contiene la variante alternativa. El TF y su secuencia consenso se resume en la Tabla 4.6.

**Tabla 4.8.: Factores de transcripción que potencialmente se unen a la secuencia consenso circundante a la variante c.-34 c>t.**

FAMILIA	DESCRIPCIÓN	SEC. CONSENSO
E2F-myc	Activador/regulador del ciclo celular	tactcGCGGaaattat

t: variante alternativa; Secuencia consenso TF en letras mayúsculas.

El TF E2F se encuentra implicado en procesos de activación y/o regulación del oncogen *MYC*, siendo necesaria la unión de E2F al promotor de *MYC* para que éste se exprese bajo un estímulo mitógeno (19). Teniendo en cuenta las características de este TF, consideramos su posible implicación en la EF como poco probable, más si cabe que el paciente el que se identificó era una mujer, pudiendo expresarse de manera diferencial en unas líneas celulares o en otras (mosaicismo) dependiendo de la activación del cromosoma X en cada línea celular.(4)

Para poder confirmar estos resultados preliminares “in silico” sería necesario realizar ensayos de geles de retardo o “Electrophoretic Mobility Shift Assay” (EMSA) y comprobar el grado de afinidad de un extracto de proteínas nucleares con un oligonucleótido sintético que contenga la variante silvestre y otro oligonucleótido sintético que contenga la variante alternativa responsable del cambio c.-34c>t.

#### 4.5.2. Análisis enzimático de las variantes c.-34 c>t y c.192 C>T (p.164=)

El análisis enzimático se realizó en muestras de plasma y en concentrado de leucocitos (véase apartado 3.8.2. y 3.8.3. de Materiales y Metodología)

Solo se pudo conseguir muestra de plasma y leucocitos del paciente c.-34 c>t, por lo que se determinó que su actividad enzimática en plasma fue de 27 nmol/mL plasma/h (138% respecto a individuos control del mismo sexo) y en extracto celular de leucocitos fue de 47,8 nmol/mg prot./h (94,4 % respecto a individuos control del mismo sexo).

Teniendo en cuenta estos resultados de actividad, la paciente portadora de la variante c.-34 c>t no podemos concluir que sea compatible con la EF. Requiriendo realizarle otro tipo de determinaciones.

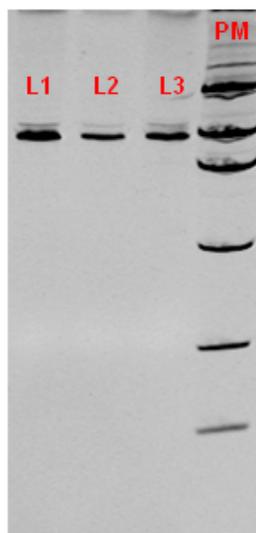
#### 4.5.3. Caracterización mediante separación de fragmentos por electroforesis en geles de PAA al 6% de la variante c.192 C>T (p.164=)

Para la caracterización electroforética (véase desde apartado 3.11.2 a 3.11.5 de Materiales y Metodología) se comparó el patrón electroforético del cDNA del gen GLA de nuestro paciente respecto al de dos individuos control sanos de su mismo sexo. (Figura 4.3.)

No se observaron diferencias en cuanto al patrón de fragmentos separados electroforéticamente.

El hecho de no encontrar un patrón de bandas correspondiente a un evento de ajuste alternativo, como se determinó bioinformáticamente en el apartado 4.4. 1. se deba probablemente a que al tratarse de una mujer, y debido al fenómeno de Lyonización, se esté expresando en la paciente el alelo silvestre en la línea celular estudiada (leucocitos).

**Figura 4.3.: Caracterización electroforética en gel de PAA al 6% del cDNA de *GLA* de la variante c.192 C>T (p.I64=).**



**Línea 1 (L1)** cDNA de *GLA* de paciente heterocigoto; **Línea 2 (L2)** cDNA de *GLA* de control 1 XX homocigoto; **Línea 3 (L3)** cDNA de *GLA* de control 2 XX homocigoto; **Línea 4** Marcador de peso molecular (**PM**) <2000 pb

Para asegurarnos bien de que el mosaicismo es la causa de esta aparente normalidad, sería fundamental contar con datos de valor de actividad enzimática en plasma y extracto de leucocitos, en fibroblastos y otros tejidos como biopsia cardíaca. También analizar perfiles de inactivación de cromosoma X (20), así niveles plasmáticos y de orina de Gb3 y Lyso-Gb3; hechos que no han sido posible en este estudio debido a la no autorización por parte de la paciente.

#### **4.6. Haplotipos Complejos Intrónicos (HCI) identificados y combinaciones de éstos. Descripción y estudios complementarios.**

En los pacientes analizados en nuestra muestra, aparecían tres HCI (ver Tabla 4.9) bien diferenciados y también algunas combinaciones de ellos.

Estos HCI se heredan juntos, distribuyéndose tanto en varones como en mujeres (ver Tabla 4.10.). El HCI más frecuente en la muestra es el Tipo II (38%) seguido del Tipo I (24%).

**Tabla 4.9.: Haplotipos Complejos Intrónicos (HCI) de nuestra muestra.**

TIPO HCI	VARIANTES	REFERENCIA SNP	LOCALIZACIÓN
<b>HCI Tipo I</b>	c.-10 c>t	rs2071225	PROMOTOR
	c.376-81_77delCAGCC	rs201869175	INTRÓN 2
	c.640-16 A>G	rs2071397	INTRÓN 4
	c.1000-22 C>T	rs2071228	INTRÓN 6
<b>HCI Tipo II</b>	c.376-81_77delCAGCC	rs201869175	INTRÓN 2
	c.640-16 A>G	rs2071397	INTRÓN 4
	c.1000-22 C>T	rs2071228	INTRÓN 6
<b>HCI Tipo III</b>	c.-12 g>a	rs3027585	PROMOTOR
	c.548-125 C>G	rs2071396	INTRÓN 3
	c.639+68 A>G	rs3027589	INTRÓN 4
	c.1000-22 C>T	rs2071228	INTRÓN 6

El análisis estadístico con prueba de Chi-cuadrado de Pearson no mostró asociación estadísticamente significativa ( $p = 0,105$ ) entre el tipo de HCI o combinación de éstos y el sexo de los pacientes.

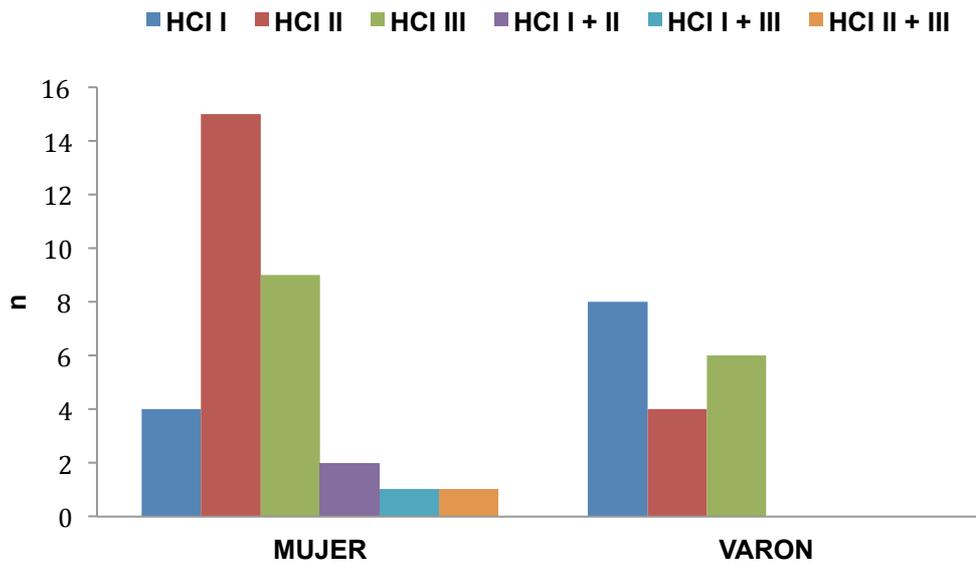
**Tabla 4.10.: Distribución de HCI y combinaciones de éstos en nuestra muestra.**

TIPO HCI	MUJERES		VARONES		TOTAL	
	n	%	n	%	n	%
HCI I	4	8	8	16	12	24
HCI II	15	3	4	12,5	19	38
HCI III	9	18	6	12	15	3
HCI I + II	2	4	0	NC	2	4
HCI I + III	1	2	0	NC	1	2
HCI II + III	1	2	0	NC	1	2
Total	32		18		50	

n = nº de pacientes analizados; NC = no calculado

La distribución de HCI y combinaciones de éstos, según sexos de nuestra muestra se ilustró en la Figura 4.4..

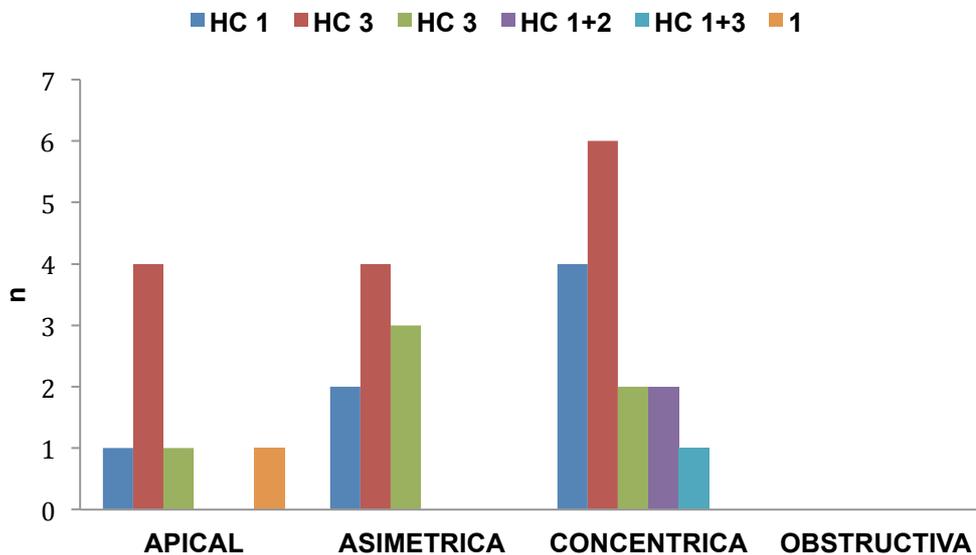
Figura 4.4.: Distribución de HCl y sus combinaciones según sexos.



n = número de pacientes

La distribución de HCl o combinaciones según el tipo alteración estructural de la pared del ventrículo izquierdo (véase apartado 3.2.de Materiales y Metodología) se mostró en la Figura 4.5.

Figura 4.5. Distribución de HCl y sus combinaciones según tipo de MHVI



n = número de pacientes

El análisis estadístico con prueba de Chi-cuadrado de Pearson no mostró asociación estadísticamente significativa ( $p=0,575$ ) entre el tipo de HCl o combinación de éstos y el tipo de alteración estructural de la pared del ventrículo izquierdo.

#### 4.6.1. Análisis enzimático

El análisis enzimático de los individuos que fueron portadores de un HCl se realizó en muestras de plasma y extracto de leucocitos (véase apartado 3.8.2. y 3.8.3. de Materiales y Metodología).

Para la población control se utilizaron 33 muestras de plasma y 26 muestras de extracto celular de leucocitos de individuos sanos; (Tabla 4.11.)

**Tabla 4.11.: Actividades enzimáticas en plasma y extracto celular de leucocitos de individuos control.**

SEXO	PLASMA		LEUCOCITOS	
	AE	n	AE	n
Mujeres	19,5±11,5	18	63±34	15
Varones	24,2±13,9	15	50,6±14,7	11
Media	20,8±12,5	33	58,1±26,6	27

Valores expresados como valor medio  $\pm$  desviación estándar expresado en plasma como nmol/mL/h y en extracto celular de leucocitos nmol/mg/h. AE: actividad enzimática

Se determinó la actividad enzimática en todos los pacientes portadores de HCl a excepción de los de Tipo II que no se solicitó nueva muestra a los centros al considerar que parece derivar finalmente en HCl Tipo I.

Los valores que se describen en la Tabla 4.10., con el fin de facilitar los cálculos, se agruparon todos los pacientes con HCl Tipo I en solitario o combinaciones, y lo mismo se procedió con los pacientes HC Tipo III; los pacientes HC Tipo I + III se agruparon en ambos grupos. (Tabla 4.12.)

**Tabla 4.12.: Actividades enzimáticas en plasma y extracto celular de leucocitos de pacientes con HCl Tipo I, Tipo III y las combinaciones de éstos.**

HCl TIPO I	SEXO	PLASMA		LEUCOCITOS	
		AE	%	AE	%
	Mujeres	18,9±7,59	97	46,3±19,40	73,5
Varones	12,7±3,07	52,5	36,38±11,16	71,9	

HCl TIPO III	SEXO	PLASMA		LEUCOCITOS	
		AE	%	AE	%
	Mujeres	14,41±3,57	73,9	52,6±21,87	83,5
Varones	15,04±5,18	62	64,9±28,72	128	

Valores expresados como media  $\pm$  desviación estándar expresado en plasma (nmol/mL/h) y en extracto celular de leucocitos (nmol/mg/h). AE: actividad enzimática. %: tanto por ciento de actividad enzimática relativa a individuos control del mismo sexo

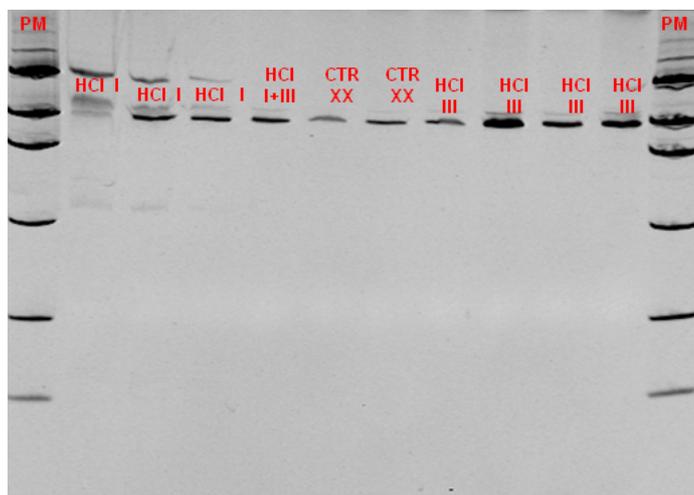
Los valores obtenidos agrupando los pacientes con HCl y el sexo, muestran valores relativos bastante elevados tanto en plasma como en extracto leucocitario por lo que en estos HCl, el nivel de actividad enzimática residual es alto, coincidiendo con resultados publicados sobre pacientes HCl Tipo I (21) y lo descrito en trabajos de nuestro grupo de investigación en pacientes con el mismo HCl (20). Respecto a los pacientes HCl Tipo III no hay trabajos previos en cuanto a caracterización enzimática por lo que aquí se muestra por primera vez el análisis enzimático en este tipo de individuos.

#### 4.6.2. Caracterización mediante separación de fragmentos por electroforesis en geles de PAA al 6%

Conocidos datos “in silico” (20) en los que se muestra variación de los sitios de ajuste de las variantes alternativas de HCl Tipo I, tratamos de caracterizar este posible efecto en el RNA total de sangre periférica, que se procesó hasta obtener cDNA específico de GLA y someterlo a electroforesis en gel de PAA al 6% (véase apartados 3.6., 3.7. y desde 3.13.12 hasta 3.15. en *Materiales y Métodos*). Comparamos el patrón electroforético del cDNA del gen *GLA* de

nuestros pacientes con HCl respecto al de dos individuos controles sanos de su mismo sexo. (Figura 4.6).

**Figura 4.6.: Caracterización electroforética en gel de PAA al 6% del cDNA de *GLA* en pacientes con HCl y combinaciones de éstas.**



Se caracterizaron todos los individuos portadores de HCl, excepto los de Tipo II por el mismo motivo indicado en el apartado 4.6.1 de este mismo capítulo.

No se observaron diferencias en cuanto al patrón de fragmentos separados electroforéticamente. El no observar ningún fragmento de diferente tamaño respecto a los controles indicó que o bien las variantes no afectan al tamaño del mRNA o bien no era la técnica más apropiada para caracterizar posibles fragmentos derivados del ajuste alternativo por ser estos pequeños.

Desde el punto de vista de la relación de estos haplotipos con la aparición de sintomatología compatible con la EF como la MHVI (véase apartado 1.4.3 de Introducción), hemos de constatar que en las publicaciones aparecidas hasta el momento no se ha demostrado el mecanismo patogénico de estos HCl, pero si se ha descrito la relación de alguno de estos HCl en pacientes con signos y síntomas asociados a la EF tales como afectación renal (22), alteraciones de la fibra nerviosa fina (21), con clínica específica de la EF (18) y con afectación renal y cardíaca (23).

Resultados no publicados todavía por nuestro grupo de investigación coinciden con otros publicados anteriormente (24) en que probablemente la alteración de

la enzima en este tipo de pacientes no se deba a cambios estructurales si no a desregulación de la expresión génica del mismo.

Como indicamos no está claro el mecanismo por el que este HCl se asocia con características de la EF, lo que sí parece unificar criterios acerca de estas variantes intrónicas es que se describen en pacientes cuya síntomas son de presentación más tardía (fenotipo tardío o atípico) que aquellos que desarrollan un fenotipo clásico, probablemente debido a que la actividad residual es elevada. Cabe señalar que la afirmación sobre el desarrollo tardío de síntomas no es del todo correcta ya que se ha reportado el caso de una paciente con HCl Tipo I, que presenta microalbuminuria como síntoma Fabry y sólo cuenta con 7 años de edad (20).

## CONCLUSIONES

## 5. CONCLUSIONES

El análisis de los resultados obtenidos en este estudio nos permite concluir que:

- I. El cribado enzimático mediante gota de sangre seca (DBS) en papel de filtro tipo FTA es una herramienta útil para el diagnóstico de Enfermedad de Fabry, pero requiere una estricta normalización en la cantidad de sangre depositada en ésta.
- II. Todo resultado, derivado del cribado mediante DBS, considerado como anómalo requiere a posteriori realizar la confirmación de valores de actividad enzimática de  $\alpha$ -Galactosidasa A en muestras de plasma y/o leucocitos.
- III. El análisis del gen *GLA* a partir de gota de sangre seca (DBS) en papel de filtro tipo FTA es una metodología eficaz para realizar el análisis de este gen con resultados similares a los obtenidos en DNA procedente muestras de sangre periférica.
- IV. Se han identificado 17 variantes en el gen *GLA* en la muestra estudiada de pacientes reclutados según criterios de miocardiopatía hipertrófica de ventrículo izquierdo (MHVI); 3 de ellas no habían sido descritas con anterioridad, otra de las variantes c.376 A>G (p.S126G) ha sido asociada previamente a Enfermedad de Fabry.
- V. Las frecuencias alélicas de las variantes c.-12 a>g; c.-10 c>t; c.376-81\_77delCAGCC; c.548-125 C>G; c.639+68 A>G; c.937 G>T (p.D313Y); c.945 C>T (p.D315=) y c.1000-22 C>T han resultado ser estadísticamente significativas en la muestra de pacientes con MHVI frente la población control cuyos datos han sido extraídos de las bases de datos Proyecto 1000 Genomas y NHLBI-ESP.
- VI. Se han identificado 3 haplotipos complejos Intrónicos (HCI) que sugieren estar asociados a la MHVI observada en la muestra.

## BIBLIOGRAFÍA

(

- 1) Pompen AWM, Ruiters M, Wyers HJG. Angiokeratoma Corporis Diffusum (Universale) Fabry, as a Sign of an Unknown Internal Disease - 2 Autopsy Reports. *Acta Med Scand* 1947;128(3):234-255.
- (2) BACH G, ROSENMAN E, KARNI A, COHEN T. Pseudodeficiency of Alpha-Galactosidase-a. *Clin Genet* 1982;21(1):59-64.
- (3) Kornreich R, Desnick RJ, Bishop DF. Nucleotide-Sequence of the Human Alpha-Galactosidase-a Gene. *Nucleic Acids Res* 1989 APR 25 1989;17(8):3301-3302.
- (4) Ioannou Y, Zeidner K, Gordon R, Desnick R. Fabry disease: Preclinical studies demonstrate the effectiveness of alpha-galactosidase A replacement in enzyme-deficient mice. *Am J Hum Genet* 2001 JAN;68(1):14-25.
- (5) Lee K, Jin X, Zhang K, Copertino L, Andrews L, Baker-Malcolm J, et al. A biochemical and pharmacological comparison of enzyme replacement therapies for the glycolipid storage disorder Fabry disease. *Glycobiology* 2003 APR;13(4):305-313.
- (6) Desnick RJ, Ioannou YA, Eng CM. a-galactosidase a deficiency: Fabry disease 2001.
- (7) Poorthuis BJ, Wevers RA, Kleijer WJ, Groener JE, de Jong JG, van Weely S, et al. The frequency of lysosomal storage diseases in The Netherlands. *Hum Genet* 1999 Jul-Aug;105(1-2):151-156.
- (8) Meikle PJ, Hopwood JJ, Clague AE, Carey WF. Prevalence of lysosomal storage disorders. *Jama-Journal of the American Medical Association* 1999 JAN 20 1999;281(3):249-254.
- (9) Spada M, Pagliardini S, Yasuda M, Tükel T, Thiagarajan G, Sakuraba H, et al. High incidence of later-onset fabry disease revealed by newborn screening. *Am J Hum Genet* 2006 Jul;79(1):31-40.
- (10) Hwu WL, Chien YH, Lee NC, Chiang SC, Dobrovolsky R, Huang AC, et al. Newborn screening for Fabry disease in Taiwan reveals a high incidence of the later-onset GLA mutation c.936+919G>A (IVS4+919G>A). *Hum Mutat* 2009 Oct;30(10):1397-1405.
- (11) Bishop DF, Kornreich R, Desnick RJ. Structural organization of the human alpha-galactosidase A gene: further evidence for the absence of a 3' untranslated region. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988 Jun;85(11):3903-3907.
- (12) Germain DP. General aspects of X-linked diseases. In: Mehta A, Beck M, Sunder-Plassmann G, editors. *Fabry Disease: Perspectives from 5 Years of FOS* Oxford: Oxford PharmaGenesis; 2006.

- (13) Lai L, Whitehair O, Wu M, O'Meara M, Lien Y. Analysis of splice-site mutations of the alpha-galactosidase A gene in Fabry disease. *Clin Genet* 2003 JUN;63(6):476-482.
- (14) Ishii S, Nakao S, Minamikawa-Tachino R, Desnick RJ, Fan JQ. Alternative splicing in the alpha-galactosidase A gene: Increased exon inclusion results in the Fabry cardiac phenotype. *Am J Hum Genet* 2002 APR 2002;70(4):994-1002.
- (15) Filoni C, Caciotti A, Carraresi L, Donati MA, Mignani R, Parini R, et al. Unbalanced GLA mRNAs ratio quantified by real-time PCR in Fabry patients' fibroblasts results in Fabry disease. *Eur J Hum Genet* 2008 Nov;16(11):1311-1317.
- (16) Valbuena C, Carvalho E, Bustorff M, Ganhao M, Relvas S, Nogueira R, et al. Kidney biopsy findings in heterozygous Fabry disease females with early nephropathy. *Virchows Archiv* 2008 OCT 2008;453(4):329-338.
- (17) Tanislav C, Kaps M, Rolfs A, Boettcher T, Lackner K, Paschke E, et al. Frequency of Fabry disease in patients with small-fibre neuropathy of unknown aetiology: a pilot study. *European Journal of Neurology* 2011 APR 2011;18(4):631-636.
- (18) Bono C, Nuzzo D, Albeggiani G, Zizzo C, Francofonte D, Iemolo F, et al. Genetic screening of Fabry patients with EcoTILLING and HRM technology. *BMC research notes* 2011 2011 Sep 06;4:323-323.
- (19) Pisani A, Imbriaco M, Zizzo C, Albeggiani G, Colomba P, Alessandro R, et al. A classical phenotype of Anderson-Fabry disease in a female patient with intronic mutations of the GLA gene: a case report. *Bmc Cardiovascular Disorders* 2012 JUN 8 2012;12:39.
- (20) Saifudeen Z, Desnick RJ, Ehrlich M. A mutation in the 5' untranslated region of the human alpha-galactosidase A gene in high-activity variants inhibits specific protein binding. *FEBS Lett* 1995 Sep 4;371(2):181-184.
- (21) Fitzmaurice TF, Desnick RJ, Bishop DF. Human alpha-galactosidase A: high plasma activity expressed by the -30G-->A allele. *J Inherit Metab Dis* 1997 Sep;20(5):643-657.
- (22) Eng CM, Resnick-Silverman LA, Niehaus DJ, Astrin KH, Desnick RJ. Nature and frequency of mutations in the alpha-galactosidase A gene that cause Fabry disease. *Am J Hum Genet* 1993 Dec;53(6):1186-1197.
- (23) Froissart R, Guffon N, Vanier MT, Desnick RJ, Maire I. Fabry disease: D313Y is an alpha-galactosidase A sequence variant that causes pseudodeficient activity in plasma. *Mol Genet Metab* 2003 Nov;80(3):307-314.

- (24) Yasuda M, Shabbeer J, Benson SD, Maire I, Burnett RM, Desnick RJ. Fabry disease: characterization of alpha-galactosidase A double mutations and the D313Y plasma enzyme pseudodeficiency allele. *Hum Mutat* 2003 Dec;22(6):486-492.
- (25) Germain DP. Fabry disease. *Orphanet J Rare Dis* 2010 Nov 22;5:30-1172-5-30.
- (26) Handa Y, Yotsumoto S, Isobe E, Sai Y, Yoshii N, Nakao S, et al. A case of symptomatic heterozygous female Fabry's disease without detectable mutation in the alpha-galactosidase gene. *Dermatology* 2000 2000;200(3):262-265.
- (27) Kampmann C, Baehner F, Whybra C, Martin C, Wiethoff CM, Ries M, et al. Cardiac manifestations of Anderson-Fabry disease in heterozygous females. *J Am Coll Cardiol* 2002 Nov 6;40(9):1668-1674.
- (28) Chimenti C, Pieroni M, Morgante E, Antuzzi D, Russo A, Russo M, et al. Prevalence of Fabry disease in female patients with late-onset hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation* 2004 AUG 31;110(9):1047-1053.
- (29) Wilcox WR, Oliveira JP, Hopkin RJ, Ortiz A, Banikazemi M, Feldt-Rasmussen U, et al. Females with Fabry disease frequently have major organ involvement: Lessons from the Fabry Registry. *Mol Genet Metab* 2008 FEB;93(2):112-128.
- (30) LYON MF. Sex chromatin and gene action in the mammalian X-chromosome. *Am J Hum Genet* 1962 Jun;14:135-148.
- (31) Garman SC, Garboczi DN. The molecular defect leading to Fabry disease: Structure of human alpha-galactosidase. *J Mol Biol* 2004 MAR 19 2004;337(2):319-335.
- (32) Desnick RJ, Ioannou YA, Eng ME. *Fabry Disease: A-Galactosidase a Deficiency*. 8th ed.: McGraw-Hill; 2001.
- (33) Schiffmann R, Warnock DG, Banikazemi M, Bultas J, Linthorst GE, Packman S, et al. Fabry disease: progression of nephropathy, and prevalence of cardiac and cerebrovascular events before enzyme replacement therapy. *Nephrol Dial Transplant* 2009 Jul;24(7):2102-2111.
- (34) Linhart A, Palecek T, Bultas J, Ferguson JJ, Hrudova J, Karetova D, et al. New insights in cardiac structural changes in patients with Fabry's disease. *Am Heart J* 2000 Jun;139(6):1101-1108.
- (35) Beck M. *Fabry Disease: Perspectives form 5 Years of FOS*. In: Mehta A, Beck M, Sunder-Plassmann G, editors. . 2006th ed. Oxford: Oxford PharmaGenesis; 2006.

(36) Desnick RJ, Allen KY, Desnick SJ, Raman MK, Bernlohr RW, Krivit W. Fabry's Disease - Enzymatic Diagnosis of Hemizygotes and Heterozygotes - Alpha-Galactosidase Activities in Plasma, Serum, Urine, and Leukocytes. *J Lab Clin Med* 1973;81(2):157-171.

(37) MAYES J, SCHEERER J, SIFERS R, DONALDSON M. Differential Assay for Lysosomal Alpha-Galactosidases in Human-Tissues and its Application to Fabry's-Disease. *Clin Chim Acta* 1981;112(2):247-251.

(38) Schirinzi A, Centra M, Prattichizzo C, Gigante M, De Fabritiis M, Giancaspro V, et al. Identification of GLA gene deletions in Fabry patients by Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA). *Mol Genet Metab* 2008 Jul;94(3):382-385.

(39) Yoshimitsu M, Higuchi K, Miyata M, Devine S, Mattman A, Sirrs S, et al. Identification of novel mutations in the alpha-galactosidase A gene in patients with Fabry disease: pitfalls of mutation analyses in patients with low alpha-galactosidase A activity. *J Cardiol* 2011 May;57(3):345-353.

(40) Poorthuis BJ, Groener JE, Ottenhoff R, Wijburg FA, Hollak CE, Aerts JM. Elevated globotriaosylsphingosine as a hallmark of Fabry disease. *Chem Phys Lipids* 2008 8;154, Supplement(0):S19-S20.

(41) Nakao S, Takenaka T, Maeda M, Kodama C, Tanaka A, Tahara M, et al. An atypical variant of Fabry's disease in men with left ventricular hypertrophy. *N Engl J Med* 1995 Aug 3;333(5):288-293.

(42) Sachdev B, Takenaka T, Teraguchi H, Tei C, Lee P, McKenna WJ, et al. Prevalence of Anderson-Fabry disease in male patients with late onset hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation* 2002 Mar 26;105(12):1407-1411.

(43) Monserrat L, Gimeno-Blanes JR, Marin F, Hermida-Prieto M, Garcia-Honrubia A, Perez I, et al. Prevalence of fabry disease in a cohort of 508 unrelated patients with hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 2007 Dec 18;50(25):2399-2403.

(44) Lang RM, Bierig M, Devereux RB, Flachskampf FA, Foster E, Pellikka PA, et al. Recommendations for chamber quantification: a report from the American Society of Echocardiography's Guidelines and Standards Committee and the Chamber Quantification Writing Group, developed in conjunction with the European Association of Echocardiography, a branch of the European Society of Cardiology. *J Am Soc Echocardiogr* 2005 Dec;18(12):1440-1463.

(45) Chamoles NA, Blanco M, Gaggioli D. Fabry disease: enzymatic diagnosis in dried blood spots on filter paper. *Clinica Chimica Acta* 2001 6;308(1-2):195-196.

(46) Civallero G, Michelin K, de Mari J, Viapiana M, Burin M, Coelho JC, et al. Twelve different enzyme assays on dried-blood filter paper samples for

detection of patients with selected inherited lysosomal storage diseases. *Clin Chim Acta* 2006 Oct;372(1-2):98-102.

(47) De Schoenmakere G, Poppe B, Wuyts B, Claes K, Cassiman D, Maes B, et al. Two-tier approach for the detection of alpha-galactosidase A deficiency in kidney transplant recipients. *Nephrol Dial Transplant* 2008 Dec;23(12):4044-4048.

(48) Gal A, Hughes DA, Winchester B. Toward a consensus in the laboratory diagnostics of Fabry disease - recommendations of a European expert group. *J Inherit Metab Dis* 2011 Apr;34(2):509-514.

(49) Hagege AA, Caudron E, Damy T, Roudaut R, Millaire A, Etchecopar-Chevreuil C, et al. Screening patients with hypertrophic cardiomyopathy for Fabry disease using a filter-paper test: the FOCUS study. *Heart* 2011 Jan;97(2):131-136.

(50) Olivova P, van der Veen K, Cullen E, Rose M, Zhang XK, Sims KB, et al. Effect of sample collection on alpha-galactosidase A enzyme activity measurements in dried blood spots on filter paper. *Clin Chim Acta* 2009 May;403(1-2):159-162.

(51) Elbin CS, Olivova P, Marashio CA, Cooper SK, Cullen E, Keutzer JM, et al. The effect of preparation, storage and shipping of dried blood spots on the activity of five lysosomal enzymes. *Clin Chim Acta* 2011 Jun 11;412(13-14):1207-1212.

(52) Gervas-Arruga J. Estudio funcional de variantes en el gen *GLA*: Implicación en la heterogeneidad clínica de la Enfermedad de Fabry y en su tratamiento. Universidad de Zaragoza; 2012.

(53) Linhart A, Palecek T, Bultas J, Ferguson J, Hrudova J, Karetova D, et al. New insights in cardiac structural changes in patients with Fabry's disease. *Am Heart J* 2000 JUN;139(6):1101-1108.

(54) Linthorst GE, Vedder AC, Aerts JMFG, Hollak CEM. Screening for Fabry disease using whole blood spots fails to identify one-third of female carriers. *Clinica Chimica Acta* 2005 3;353(1-2):201-203.

(55) Brouns R, Thijs V, Eyskens F, Van den Broeck M, Belachew S, Van Broeckhoven C, et al. Belgian Fabry study: prevalence of Fabry disease in a cohort of 1000 young patients with cerebrovascular disease. *Stroke* 2010 May;41(5):863-868.

(56) Branton MH, Schiffmann R, Sabnis SG, Murray GJ, Quirk JM, Altarescu G, et al. Natural history of Fabry renal disease: influence of alpha-galactosidase A activity and genetic mutations on clinical course. *Medicine (Baltimore)* 2002 Mar;81(2):122-138.

(57) Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev* 2002 JAN 1 2002;16(1):6-21.

(58) Rakyan VK, Beck S. Epigenetic variation and inheritance in mammals. *Curr Opin Genet Dev* 2006 DEC 2006;16(6):573-577.

(59) Whitelaw NC, Whitelaw E. How lifetimes shape epigenotype within and across generations. *Hum Mol Genet* 2006 OCT 15 2006;15:R131-R137.

(60) Oswald F, Lovec H, Moroy T, Lipp M. E2F-dependent regulation of human MYC: trans-activation by cyclins D1 and A overrides tumour suppressor protein functions. *Oncogene* 1994 Jul;9(7):2029-2036.