

Javier Gervás Arruga

Estudio funcional de variantes en el gen GLA: implicación en la heterogeneidad clínica de la enfermedad de Fabry y en su tratamiento

Departamento
Bioquímica y Biología Molecular y Celular

Director/es

Pocoví Mieras, Miguel
Giraldo Castellano, Pilar

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>



Universidad
Zaragoza

Tesis Doctoral

ESTUDIO FUNCIONAL DE VARIANTES EN EL GEN
GLA: IMPLICACIÓN EN LA HETEROGENEIDAD
CLÍNICA DE LA ENFERMEDAD DE FABRY Y EN SU
TRATAMIENTO

Autor

Javier Gervás Arruga

Director/es

Pocoví Mieras, Miguel
Giraldo Castellano, Pilar

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

Bioquímica y Biología Molecular y Celular

2013

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR



Universidad
Zaragoza

TESIS DOCTORAL

**ESTUDIO FUNCIONAL DE VARIANTES EN EL GEN *GLA*:
IMPLICACIÓN EN LA HETEROGENEIDAD CLÍNICA DE LA
ENFERMEDAD DE FABRY Y EN SU TRATAMIENTO.**

JAVIER GERVÁS ARRUGA

2012

D. MIGUEL POCOVÍ MIERAS, Doctor en Ciencias Químicas, catedrático del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular de la Universidad de Zaragoza; y

Dña. PILAR GIRALDO CASTELLANO, Doctora en Medicina y Cirugía, jefe de sección de Hematología del Hospital Universitario Miguel Servet, profesora titular del Departamento de Medicina y Psiquiatría de la Universidad de Zaragoza e investigador asociado del Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud,

codirectores de esta Tesis Doctoral,

CERTIFICAN:

Que la Memoria de Tesis Doctoral titulada: **“Estudio funcional de variantes en el gen *GLA*: Implicación en la heterogeneidad clínica de la enfermedad de Fabry y en su tratamiento”**, presentada por D. Javier Gervás Arruga, ha sido realizada en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular de la Universidad de Zaragoza y en la Unidad de Investigación Traslacional del Hospital Universitario Miguel Servet bajo su dirección, y que reúne los requisitos necesarios para ser presentada por su autor para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Zaragoza.

Zaragoza, 31 de octubre de 2012

Miguel Pocoví Mieras

Pilar Giraldo Castellano

ÍNDICE

Índice

1.	INTRODUCCIÓN	1
1.1	ANTECEDENTES HISTÓRICOS	1
1.2	EPIDEMIOLOGÍA.....	2
1.3	GENÉTICA MOLECULAR EN LA EF	3
1.3.1	<i>Mutaciones en el gen GLA</i>	4
1.3.2	<i>Correlación genotipo-fenotipo</i>	7
1.3.3	<i>Correlaciones epigenéticas entre genotipo-fenotipo</i>	7
1.3.4	<i>Bases genéticas y moleculares de la EF en mujeres</i>	11
1.4	BASES PATOLÓGICAS DE LA EF	13
1.5	FISIOPATOLOGÍA DE LA EF	15
1.6	ESTRUCTURA DE LA A-GALACTOSIDASA A HUMANA	16
1.7	MANIFESTACIONES CLÍNICAS DE LA EF.....	18
1.7.1	<i>Síntomas tempranos de la EF</i>	18
1.7.2	<i>Afectación renal</i>	21
1.7.3	<i>Afectación cardíaca</i>	22
1.7.4	<i>Afectación cerebrovascular</i>	23
1.7.5	<i>Trastornos auditivos y vestibulares</i>	24
1.7.6	<i>Trastornos oculares</i>	24
1.7.7	<i>Afectación respiratoria</i>	25
1.7.8	<i>Depresión y calidad de vida</i>	25
1.8	DIAGNÓSTICO	26
1.8.1	<i>Diagnóstico enzimático</i>	27
1.8.2	<i>Análisis mutacional</i>	28
1.8.3	<i>Detección de productos de acúmulo</i>	30
1.8.4	<i>Medida de la actividad de α-galactosidasa A en gota de sangre seca</i>	30
1.9	OTROS MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO.	31
1.9.1	<i>Histología</i>	31
1.10	BIOMARCADORES EN LA EF.....	32
1.11	TRATAMIENTO	33
1.11.1	<i>Terapia enzimática sustitutiva</i>	33
1.11.2	<i>Terapia de reducción de sustrato</i>	35
1.11.3	<i>Tratamiento con chaperonas</i>	35
2.	OBJETIVOS	37
3.	MATERIALES Y MÉTODOS	40

ÍNDICE

3.1	PACIENTES Y CONTROLES.....	40
3.2	EXTRACCIÓN DE MUESTRAS DE SANGRE PERIFÉRICA	40
3.3	OBTENCIÓN DE UN CONCENTRADO DE LEUCOCITOS A PARTIR DE SANGRE PERIFÉRICA.....	41
3.4	BIOPSIAS DE PIEL	42
3.5	BIOPSIA DE RIÑÓN. PROCEDIMIENTO Y PROCESADO.....	42
3.6	OBTENCIÓN DE DNA GENÓMICO.....	43
3.6.1	<i>De muestras de sangre periférica</i>	43
3.6.2	<i>A partir de fibroblastos de cultivo primario</i>	43
3.6.3	<i>Análisis de concentración y pureza</i>	44
3.7	OBTENCIÓN DE RNA TOTAL.....	44
3.7.1	<i>De muestras de sangre periférica.</i>	44
3.7.2	<i>A partir de fibroblastos de cultivo primario</i>	45
3.8	CUANTIFICACIÓN; DETERMINACIÓN DE LA PUREZA Y PURIFICACIÓN	45
3.8.1	<i>Cuantificación del RNA por espectrofotometría</i>	45
3.8.2	<i>Purificación del RNA total.....</i>	46
3.8.3	<i>Determinación de la integridad del RNA</i>	46
3.9	ANÁLISIS MOLECULAR DEL GEN <i>GLA</i>	46
3.9.1	<i>Purificación de los productos de PCR mediante ExoSAP-IT® (USB).....</i>	49
3.9.2	<i>Análisis de la secuencia de los amplicones mediante secuenciación.....</i>	49
3.10	SÍNTESIS DE CDNA	50
3.10.1	<i>Control de síntesis de cDNA mediante PCR.....</i>	51
3.11	ANÁLISIS DE VARIANTES DE AJUSTE ALTERNATIVO.	52
3.11.1	<i>Análisis de variantes “in silico”</i>	52
3.11.2	<i>Identificación mediante clonación de los fragmentos adyacentes a los polimorfismos IVS4-16A>G y IVS6-22C>T del gen GLA.....</i>	53
3.11.2.1	<i>Obtención de bacterias competentes E.coli JM109 mediante CaCl2</i>	53
3.11.2.2	<i>Amplificación de las juntas de unión del intrón 3-4 y 5-6 del gen GLA</i>	53
3.11.2.3	<i>Clonaje de los amplicones obtenidos a partir del cDNA de GLA con el plásmido pGEM-T easy (Promega).....</i>	54
3.11.2.4	<i>Transformación y cultivo de bacterias competentes E.coli JM109.....</i>	55
3.11.2.5	<i>Cribado de colonias por PCR</i>	56
3.11.2.6	<i>Obtención y purificación del plásmido.....</i>	56
3.11.2.7	<i>Obtención de la secuencia de los insertos</i>	57
3.11.3	<i>Caracterización mediante la separación de fragmentos por electroforesis en geles de poliacrilamida al 6%.....</i>	57
3.11.4	<i>Identificación mediante la secuenciación del cDNA completo del gen GLA.....</i>	58
3.11.5	<i>Clonaje de la región 3’ del intrón 6 del gen GLA</i>	59

3.12	ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA POR PCR CUANTITATIVA A TIEMPO REAL (RT-QPCR)	60
3.12.1	<i>Análisis mediante el uso de sondas TaqMan</i>	60
3.12.2	<i>Rectas estándar</i>	62
3.12.3	<i>Normalización de los datos</i>	63
3.12.4	<i>Cuantificación relativa</i>	63
3.13	BÚSQUEDA DE SITIOS DE UNIÓN A FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN EN LA ZONA PROMOTORA CIRCUNDANTE AL POLIMORFISMO IVSO-10C>T.....	63
3.13.1	<i>Análisis “in silico”</i>	63
3.13.2	<i>Geles de retardo. Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)</i>	63
3.14	ANÁLISIS DE METILACIÓN.....	64
3.14.1	<i>Tratamiento con bisulfito</i>	64
3.14.2	<i>Estudio de la metilación de islas CpG de la región promotora de GLA (-68_+140) ..</i> 65	
3.14.2.1	Diseño y optimización de una PCR bisulfito-específica	65
3.14.2.2	Análisis de metilación por pirosecuenciación	67
3.14.2.3	Preparación de las muestras y análisis de la metilación	68
3.15	DETERMINACIÓN DE LA INACTIVACIÓN DEL CROMOSOMA X MEDIANTE ELECTROFORESIS CAPILAR METIL-ESPECÍFICA.....	69
3.15.1	<i>Diseño y optimización de PCR-metil específica</i>	69
3.15.2	<i>Electroforesis capilar</i>	70
3.16	MEDIDAS DE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA A-GALACTOSIDASA A	71
3.16.1	<i>Medida de la actividad enzimática en muestras de plasma y leucocitos</i>	71
3.16.2	<i>Medida de la actividad enzimática en cultivos primarios de fibroblastos</i>	72
3.17	MEDIDA DE CITOQUINAS PROINFLAMATORIAS EN PLASMA.....	72
3.18	CULTIVO Y MANTENIMIENTO DE LAS LÍNEAS PRIMARIAS DE FIBROBLASTOS HUMANOS	73
3.18.1	<i>Subcultivo de fibroblastos</i>	74
3.18.2	<i>Congelación de células</i>	74
3.18.3	<i>Descongelación de células</i>	75
3.19	ANÁLISIS DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR EN FIBROBLASTOS.....	75
3.20	MEDIDA DEL ACÚMULO DE GALACTO/GLUCOESFINGOLÍPIDOS EN CULTIVOS PRIMARIOS DE FIBROBLASTOS HUMANOS	76
3.20.1	<i>Cultivo de fibroblastos</i>	76
3.20.2	<i>Obtención del lisado celular</i>	76
3.20.3	<i>Extracción lipídica y análisis por HPTLC</i>	77
3.21	ANÁLISIS DE LA TOXICIDAD PARA 5-AZACITIDINA (AZAC) EN FIBROBLASTOS	78
3.22	EFFECTO DEL TRATAMIENTO CON 5-AZACITIDINA EN CULTIVOS PRIMARIOS DE FIBROBLASTOS.....	79
3.22.1	<i>Análisis del perfil de activación del cromosoma X en cultivos primarios de fibroblastos bajo la acción de la 5-azacitidina</i>	80

3.22.2	<i>Análisis de la expresión del gen GLA en cultivos primarios de fibroblastos bajo la acción de la 5-azacitidina.....</i>	81
3.22.3	<i>Análisis de la actividad enzimática de la α-galactosidasa A en cultivos primarios de fibroblastos bajo la acción de la 5-azacitidina.....</i>	82
3.23	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	82
4.	RESULTADOS	84
4.1	DESCRIPCIÓN DE LAS MANIFESTACIONES CLÍNICAS DE LOS PACIENTES	84
4.1.1	<i>Familia 1</i>	84
4.1.2	<i>Familia 2</i>	86
4.2	ANÁLISIS GENÉTICO.....	87
4.3	ANÁLISIS ENZIMÁTICO	89
4.3.1	<i>Análisis enzimático en muestras de plasma y leucocitos.....</i>	89
4.3.2	<i>Análisis enzimático en cultivos celulares primarios de fibroblastos</i>	91
4.4	ANÁLISIS DE VARIANTES DE AJUSTE ALTERNATIVO	92
4.4.1	<i>Análisis de variantes “in silico”</i>	92
4.4.2	<i>Identificación mediante clonación de los fragmentos adyacentes a los polimorfismos IVS4-16A>G y IVS6-22C>T del gen GLA</i>	93
4.4.3	<i>Caracterización mediante la separación de fragmentos por electroforesis en geles de poliacrilamida al 6%.....</i>	95
4.4.4	<i>Identificación mediante la secuenciación del cDNA completo del gen GLA.....</i>	96
4.4.5	<i>Clonaje de la región 3’ del intrón 6 del gen GLA</i>	96
4.4.6	<i>Análisis de la expresión génica por PCR cuantitativa (RT-qPCR)</i>	97
4.5	BÚSQUEDA DE SITIOS DE UNIÓN DE FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN A LA ZONA PROMOTORA CIRCUNDANTE A LA VARIANTE IVS0-10C>T	100
4.5.1	<i>Análisis “in silico”</i>	100
4.5.1	<i>Estudios en gel de retardo. Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA).....</i>	100
4.6	ANÁLISIS DE METILACIÓN	101
4.6.1	<i>Estudio de la metilación de islas CpG de la región promotora de GLA (-68_+140).....</i>	101
4.6.2	<i>Determinación de la inactivación del cromosoma X mediante electroforesis capilar metil-específica</i>	107
4.7	MEDIDA DE CITOQUINAS PROINFLAMATORIAS EN PLASMA.	111
4.8	ANÁLISIS DEL PERFIL DE GALACTO/GLUCOESFINGOLÍPIDOS EN EXTRACTOS DE FIBROBLASTO POR HPTLC	114
4.9	ANÁLISIS DE LA TOXICIDAD PARA EL FÁRMACO 5-AZACITIDINA EN FIBROBLASTOS.	116
4.10	ANÁLISIS DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR EN FIBROBLASTOS.....	116
4.11	EFEECTO DEL TRATAMIENTO CON 5-AZACITIDINA (AZAC) EN CULTIVOS PRIMARIOS DE FIBROBLASTOS	118

4.11.1	<i>Análisis del perfil de activación del cromosoma X en cultivos primarios de fibroblastos bajo la acción de la 5-azacitidina.</i>	118
4.11.2	<i>Análisis de la expresión del gen GLA en cultivos primarios de fibroblastos bajo la acción de la 5-azacitidina</i>	120
4.12	ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA A-GALACTOSIDASA A EN CULTIVOS PRIMARIOS DE FIBROBLASTOS BAJO LA ACCIÓN DE LA 5-AZACITIDINA	124
5.	DISCUSIÓN	127
5.1	IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA HERENCIA DE VARIANTES EN EF	127
5.2	IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL PATRÓN DE EXPRESIÓN DEL GEN <i>GLA</i>	128
5.3	SITIOS DE UNIÓN A FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN EN LA ZONA PROMOTORA CIRCUNDANTE A LA VARIANTE IVSO-10C>T	130
5.4	ESTUDIO DE LA METILACIÓN DE LA REGIÓN PROMOTORA DEL GEN <i>GLA</i>	131
5.5	DETERMINACIÓN DE LA INACTIVACIÓN DEL CROMOSOMA X	132
5.6	ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN EF	134
5.7	RELACIÓN GENOTIPO-FENOTIPO	135
5.8	BÚSQUEDA DE NUEVOS BIOMARCADORES	136
5.9	ESTUDIOS DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR	138
5.10	NUEVA APROXIMACIÓN TERAPÉUTICA MEDIANTE EL USO DE AGENTES HIPOMETILANTES EN LA EF	139
5.11	HIPOTESIS SOBRE LA AFECTACIÓN MULTIORGÁNICA EN EF	144
6.	CONCLUSIONES	146
7.	BIBLIOGRAFÍA	I

Índice de figuras

Figura 1.1: Defecto enzimático de la EF	1
Figura 1.2: Doctor Johannes Fabry y Doctor William Anderson.....	2
Figura 1.3: Estructura del gen <i>GLA</i>	3
Figura 1.4: Mecanismo de ajuste general	5
Figura 1.5: Metilación del DNA mediante la acción de las DNA metiltransferasas....	8
Figura 1.6: Acetilación de histonas mediante los complejos enzimas histona acetiltransferasas.....	10
Figura 1.7: Mecanismos de inactivación del cromosoma X.....	12
Figura 1.8: Patrón de expresión del color naranja ligado al cromosoma X en gatos.	13
Figura 1.9: Diferentes tipos de esfingolípidos.....	14
Figura 1.10: Visión general de la estructura de la α -galactosidasa A humana.....	16
Figura 1.11: Centro activo de la enzima.....	17
Figura 1.12: Mecanismo catalítico de la enzima.	18
Figura 1.13: Angioqueratoma.....	19
Figura 1.14: Biopsia de riñón en un paciente con EF.....	21
Figura 1.15: Ecocardiografía	22
Figura 1.16: RMI cardiaca para la valoración de HVI y fibrosis.	23
Figura 1.17: Córnea de una paciente heterocigota	25
Figura 1.18: Imagen de microscopia electrónica de una biopsia de riñón.	31
Figura 1.19: Mecanismo para las chaperonas específicas del centro activo.	36
Figura 3.1: Sondas Taqman	61
Figura 3.2: Mesa de vacío para la preparación de muestras.....	68
Figura 3.3: Recta de calibrado del sustrato umbeliferona.en leucocitos	72
Figura 3.4: Recta de calibrado del sustrato umbeliferona.en fibroblastos.....	82
Figura 4.1: Vacuolización citoplasmática observada en un podocito del paciente F1.4).....	85
Figura 4.2: Pedigrí familia 1	88
Figura 4.3: Pedigrí familia 2.....	89
Figura 4.4: Valores de actividad enzimática de los extractos de fibroblastos representados en % con respecto a la muestra control.	92
Figura 4.5: Amplificación de las zonas cercanas a los exones 5 y 7.....	94

Figura 4.6: Electroforesis en gel de PAA al 6% de las juntas de los exones.....	94
Figura 4.7: Electroforesis en gel de poliacrilamida al 6% de las muestras del cDNA del mensajero completo de <i>GLA</i> en la familia 1, familia 2.....	96
Figura 4.8: Representación de la señal de amplificación para el gen <i>GAPDH</i> , los transcritos <i>GLA</i> y <i>GLA-M</i>	97
Figura 4.9: Resultados de la cuantificación relativa (RQ) mediante qPCR del transcrito fisiológico de <i>GLA</i> y <i>GLA-M</i> (fragmento clonado) de los controles, portadores de la familia 1 y la familia 2.	98
Figura 4.10: Comparación de la cuantificación relativa (RQ) de los transcritos <i>GLA</i> y <i>GLA-M</i> entre portadores y pacientes.	99
Figura 4.11: Comparación de la expresión relativa (RQ) de <i>GLA</i> y <i>GLA-M</i> entre varones y mujeres.	99
Figura 4.12: EMSA.....	101
Figura 4.13: Pirogramas de las posiciones de metilación de la zona promotora del gen <i>GLA</i>	102
Figura 4.14: Perfil de metilación entre varones y mujeres.	103
Figura 4.15: Perfil de metilación entre el grupo control sano y el grupo de portadoras y enfermas.....	104
Figura 4.16: Perfil de metilación entre el grupo control sano y el grupo de portadoras del HCI y portadoras de la mutación G183V.	105
Figura 4.17: Perfil de metilación entre el grupo control y el grupo de hemicigotos para el HCI y la mutación G183V	106
Figura 4.18: Perfil de metilación entre el grupo control sano y el grupo de varones enfermos.....	106
Figura 4.19: Patrón de metilación para los controles.....	107
Figura 4.20: Patrón de metilación y genotipado (tamaño del fragmento del AR) de la familia 1.	108
Figura 4.21: Patrón de metilación y genotipado (tamaño del fragmento del AR) de la familia 2.	108
Figura 4.22: Porcentaje de activación del cromosoma X portador del HCI en la familia 1.	110

Figura 4.23: Porcentaje de activación del cromosoma X portador de la mutación G183V en la familia 2.	110
Figura 4.24: Comparación entre los valores medios de concentración de citoquinas plasmáticas entre los controles, los portadores de la mutación G183V y los del HCl	112
Figura 4.25: Comparación entre los valores medios de concentración de citoquinas plasmáticas entre los controles y los portadores.....	113
Figura 4.26: Comparación entre los valores medios de concentración de citoquinas plasmáticas entre los varones portadores del HCl y las mujeres portadoras del HCl y G183V	113
Figura 4.27: Cromatograma mostrado por la mezcla de patrones.	114
Figura 4.28: Cromatograma mostrado por la muestra control y la muestra de la paciente portadora del HCl	115
Figura 4.29: Ensayo de toxicidad en fibroblastos para el fármaco hipometilante 5-azacitidina a las 72 horas	116
Figura 4.30: Cultivo de fibroblastos del portador F2.3 y F1.1 a día 6	117
Figura 4.31: Perfil de proliferación celular del Control, los portadores del HCl (F1.1, F1.3, F1.4) y los de la variante G183V (F2.1, F2.3)	118
Figura 4.32: Perfil de activación del alelo silvestre.....	119
Figura 4.33: Perfil de activación del alelo mutado.....	119
Figura 4.34: Perfil de activación del cromosoma X para un hemizigoto del HCl. ..	120
Figura 4.35: Perfil de expresión del gen <i>GLA</i> a las concentraciones 0, 6,25 y 12,5 μ M.	121
Figura 4.36: Perfil de expresión del transcrito <i>GLA-M</i> a las concentraciones 0, 6,25 y 12,5 μ M	121
Figura 4.37: Perfil de expresión <i>GLA</i> y <i>GLA-M</i> sin el tratamiento.....	122
Figura 4.38: Perfil de expresión de <i>GLA</i> y <i>GLA-M</i> a una concentración de fármaco de 6,25 μ M.....	123
Figura 4.39: Perfil de expresión de <i>GLA</i> y <i>GLA-M</i> a una concentración de fármaco de 12,5 μ M.....	123
Figura 4.40: Variación de la actividad enzimática (AE) en fibroblastos a distintas concentraciones de AzaC.....	124

Figura 4.41: Actividad enzimática (AE) de los fibroblastos antes del tratamiento con 5-azacitidina.....	125
Figura 4.42: Actividad enzimática (AE) de los fibroblastos después del tratamiento con 5-azacitidina a una concentración de 12,5 μ M.....	125
Figura 4.43: Tasa de la variación enzimática para las concentraciones de AzaC 6,25 μ M y 12,5 μ M.	126
Figura 5.1: Conservación del aminoácido en la posición 183 de la secuencia de aminoácidos que codifica para la α -galactosidasa A.	128
Figura 5.2: Estructuras generadas por la variante ISV6-22C>T.....	143

Índice de tablas

Tabla 1.1: Polimorfismos del gen <i>GLA</i> humano.	6
Tabla 1.2: Síntomas tempranos en la EF.	20
Tabla 3.1: Cebadores para la amplificación del gen <i>GLA</i>	47
Tabla 3.2: Cantidades y concentraciones finales para las amplificaciones por PCR del gen <i>GLA</i>	48
Tabla 3.3: Cantidades de los reactivos empleados en la reacción de secuenciación.	50
Tabla 3.4: Cebadores para la amplificación de un fragmento del RNA mensajero de la β -Actina.	51
Tabla 3.5: Cantidades y concentraciones finales para la reacción de PCR.	52
Tabla 3.6: Cebadores para las amplificaciones de las juntas de los intrones 3-4, 5-6 en el gen <i>GLA</i>	54
Tabla 3.7: Cantidades y concentraciones utilizadas en la reacción de ligación.	55
Tabla 3.8: Amplificación de la zona de clonaje del plásmido pGEM-T mediante cebadores universales.	56
Tabla 3.9: Cebadores para la amplificación del mensajero de gen <i>GLA</i>	57
Tabla 3.10: Cantidades y concentraciones finales para la amplificación del RNA mensajero del gen <i>GLA</i> por PCR.	58
Tabla 3.11: Cebadores para la amplificación anidada del RNA mensajero del gen <i>GLA</i>	59
Tabla 3.12: Cebadores y sondas para el estudio de la expresión del gen <i>GLA</i>	61
Tabla 3.13: Cantidades y concentraciones finales para la amplificación del RNA mensajero del gen <i>GLA</i> , el gen <i>GAPDH</i> y el transcrito <i>GLA-M</i> por PCR cuantitativa a tiempo real.	62
Tabla 3.14: Cebadores para la amplificación bisulfito-específica de la región promotora del gen <i>GLA</i> (-68_+140).	66
Tabla 3.15: Cantidades y concentraciones para la PCR-bisulfito-específica de la región promotora del gen <i>GLA</i> (-68_+140).	66
Tabla 3.16: Características de las sondas para el análisis por pirosecuenciación.	67
Tabla 3.17: Cebadores para la amplificación específica de DNA no metilado tratado con bisulfito.	70

Tabla 3.18: Cantidades y concentraciones para la reacción de PCR-metil-específica.	70
Tabla 3.19: Condiciones de electroforesis capilar para el genotipado de HUMARA y la cuantificación de la metilación del cromosoma X.	71
Tabla 4.1: Haplotipo Complejo Intrónico (HCI)	87
Tabla 4.2: Mutación puntual de cambio de aminoácido en la familia 2.	88
Tabla 4.3: Tabla de valores de la actividad enzimática de la α -galactosidasa A en plasma y en extractos de leucocitos, fragmentados por ultrasonidos, de controles sanos.....	89
Tabla 4.4: Tabla de actividades enzimáticas para los sujetos de la familia 1 y la familia 2.	91
Tabla 4.5: Resultados del análisis “ <i>in silico</i> ” para las variantes encontradas en las dos familias.....	93
Tabla 4.6: Factores de transcripción que potencialmente se unen a la secuencia consenso circundante al polimorfismo ISV0-10C>T.	100
Tabla 4.7: Valores de las diferentes áreas alélicas (AAM= Área alelo mutado en unidades arbitrarias AAS= Área alelo sano en unidades arbitrarias), % de activación y genotipo del receptor de andrógenos (AM=alelo mutado, AS=alelo sano).....	109
Tabla 4.8: Valores medios de las concentraciones plasmáticas de citoquinas (pg/ml).	111

Enlaces

HGV www.genomic.unimelb.edu.au/mdi/

Ensembl www.ensembl.org

Neural Network (SSPNN) www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html

MethPrimer www.urogene.org/methprimer/

mfold <http://mfold.rna.albany.edu>

Abreviaturas

λ	Longitud de onda
3'-UTR	Región 3' no transcrita
A	Adenina
APS	Persulfato de amonio
AzaC	5-azacitidina
C	Citosina
CTH	Ceramida trihexosido, Gb ₃
ddNTPs	Didesoxinucleotidos trifosfato terminadores
DE	Desviación estándar
DGJ	1-Deoxigalactonojirimicina
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNMTi	Inhibidores de las metiltransferasas de DNA
DNMTs	DNA metiltransferasas
dNTPs	Nucleótidos
DTT	Ditiotritol
E	Eficiencia de la amplificación
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EF	Enfermedad de Fabry

EG	Enfermedad de Gaucher
EMSA	Electrophoretic Mobility Shift Assay
ERAD	Degradación asociada al retículo endoplasmático
G	Guanina
Ga ₂	Galabiosilceramida
Gb ₃	Globotriaosilceramida
Gb ₄	Globotetraosilceramida
GFR	Tasa de filtrado glomerular
HATs	Enzimas histona acetiltransferasas
HCI	Haplotipo complejo intrónico
HDACs	Histona deacetilasas
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
HPTLC	Cromatografía en capa fina de alta resolución
HUMARA	Gen del receptor de andrógenos humano
HVI	Hipertrofia ventricular izquierda
LB	Medio de cultivo Luria Bertani
PAA	Poliacrilamida
pb	Pares de bases
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Del inglés, Polymerase Chain Reaction (reacción en cadena de la polimerasa)

PPi	Pirofosfato inorgánico
qPCR	PCR cuantitativa a tiempo real
RE	Retículo endoplasmático
RMI	Resonancia magnética de imagen
RQ	Cuantificación relativa
SAM	S-adenosil-I-metionina
SFB	Suero fetal bovino
T	Timina
TAE	Tris-acético-EDTA
TBE	Tris-boro-EDTA
TE	Tris-clorídrico-EDTA
TEMED	N,N,N,N'-tetrametilendiamina
TES	Terapia enzimática sustitutiva
Th	Temperatura de hibridación
U	Uracilo
V	Voltio
Xa	Cromosoma X activo
Xi	Cromosoma X inactivo

INTRODUCCIÓN

1. Introducción

La enfermedad de Anderson-Fabry (EF), también conocida como “*angiokeratoma corporis diffusum*”, es una enfermedad metabólica hereditaria ligada al cromosoma X, caracterizada por un defecto en la degradación de los glucoesfingolípidos, que conlleva a su acúmulo en los lisosomas de varios tejidos. La causa de la enfermedad radica en una mutación o desregulación de un gen localizado en el brazo largo del cromosoma X que codifica la enzima lisosomal α -galactosidasa A. Esta enzima tiene la función de hidrolizar los residuos terminales de α -galactosa en los glucoesfingolípidos.

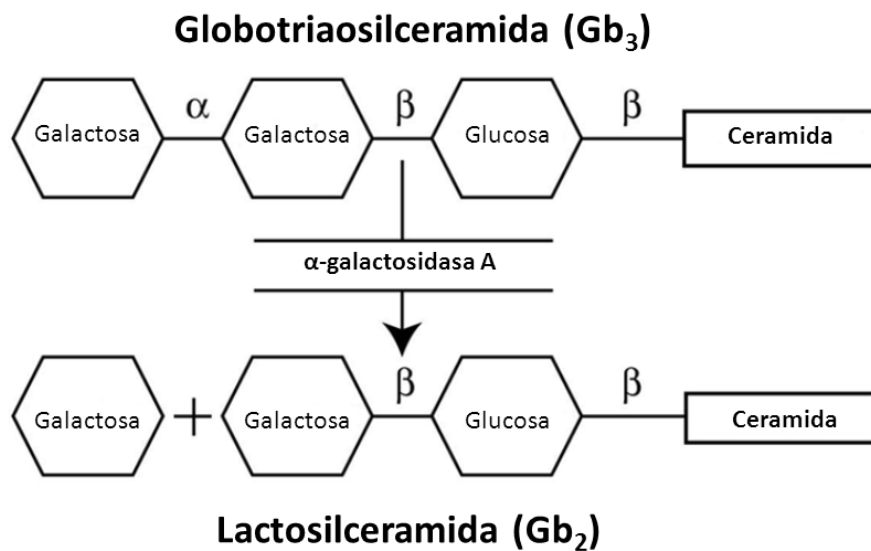


Figura 1.1: Defecto enzimático de la EF. Impide la liberación de la galactosa terminal de Gb₃.

1.1 Antecedentes históricos

La EF fue descrita por primera vez en el siglo XIX. En 1898, William Anderson, médico inglés y Johannes Fabry, dermatólogo alemán, documentaron la enfermedad por primera vez independientemente el uno del otro (Anderson, 1898, Fabry, 1898) (figura 1.2). Los dos describieron a un paciente varón con una erupción cutánea a la que se refirieron como “ectasia de los capilares cutáneos”. Anderson también

INTRODUCCIÓN

describió en el paciente proteinuria. Cincuenta años después, Pompen, basándose en evidencias observadas en autopsias, intuyó una alteración de depósito generalizada (Pompen, et al., 1947). En la década de los sesenta, fueron caracterizados los glucoesfingolípidos de los acúmulos lisosomales e identificada la enzima alterada en la enfermedad (Bach, et al., 1982, Schleicher, et al., 1996). El mayor hito en la historia de la EF se produjo al descifrar el gen que codifica para la enzima α -galactosidasa A por Kornreich y colaboradores en 1989 (Kornreich, et al., 1989). Ese descubrimiento proporcionó el primer paso, necesario para la producción “*in vitro*” de la enzima recombinante y su uso como terapia enzimática sustitutiva (TES) en la actualidad.



Figura 1.2: Doctor Johannes Fabry (izquierda) y Doctor William Anderson (derecha).

1.2 Epidemiología

La EF es panétnica aunque su prevalencia varía entre los diferentes grupos étnicos. Debido a la naturaleza de la enfermedad, resulta complicado conocer la frecuencia precisa de la misma. Las prevalencias publicadas van desde 1 de cada 476.000 habitantes (Poorthuis, et al., 1999) a 1 de cada 117.000 (Meikle, et al., 1999) en

población general. Sin embargo, el diagnóstico podría estar subestimado; especialmente en individuos con variantes de la enfermedad atípicas. Desnick postuló que la verdadera prevalencia podría ser tan elevada como 1 de cada 40.000 habitantes (Desnick, et al., 2001). Las iniciativas de cribado neonatal han aportado datos de una prevalencia mucho mayor. 1 de cada 3.100 neonatos en el estudio italiano (Spada, et al., 2006), con elevada prevalencia dentro del grupo de los varones (1 de cada 1.500). En un cribado Taiwanés se encontró una prevalencia en varones neonatos de 1 cada 1.250 (Hwu, et al., 2009). Este estudio demostró que el 86% tenía una mutación de ajuste intrónica, IVS4+919G > A, descrita previamente como asociada a fenotipo cardiaco tardío (Ishii, et al., 2002).

1.3 Genética molecular en la EF

El gen *GLA*, que codifica la enzima α -galactosidasa A, está localizado en el brazo largo del cromosoma X, en la región Xq22.1. Está compuesto por siete exones comprendidos en un rango de tamaño, que oscila entre las 92 y 291 pares de bases (pb) (figura 1.3). La región codificante, tiene un tamaño de 1.292 pb y codifica un polipéptido de 429 aminoácidos. El gen humano *GLA* tiene la peculiaridad de que no tiene zona 3' no transcrita (3'-UTR) y tiene la señal de poliadenilación del RNA mensajero en la zona codificante.

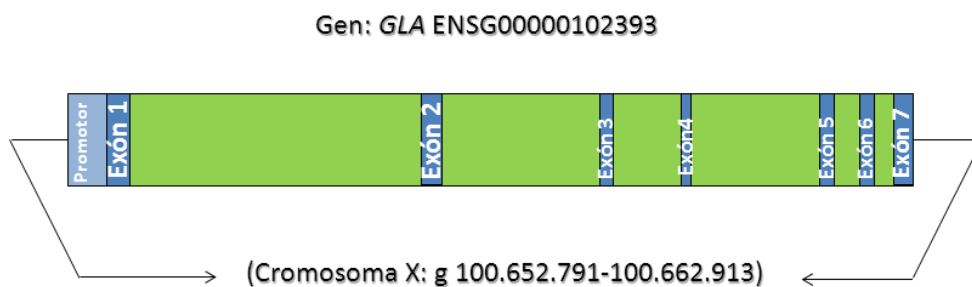


Figura 1.3: Estructura del gen *GLA*. Compuesto por una región promotora (azul claro), siete exones (azul) y seis regiones intrónicas (verde).

La transmisión de la enfermedad se produce por herencia recesiva ligada al cromosoma X. Las mujeres portadoras transmiten el alelo defectuoso a la mitad de su progenie, mientras que los varones afectados lo transmiten a todos sus hijos.

INTRODUCCIÓN

1.3.1 Mutaciones en el gen *GLA*

Hasta el presente, han sido descritas más de 600 variantes en *GLA*. Estas están recogidas en la página web de la HGV (Human Genome Variation Society) (ver enlaces). El 75% son mutaciones puntuales (de cambio de aminoácido “missense”, generación de un codón de parada “nonsense”, de ajuste y polimorfismos) y el 25% restante pequeños reordenamientos (principalmente deleciones y duplicaciones).

En un principio la enfermedad causada por una mutación de cambio de aminoácido debería ser consecuencia de los cambios estructurales en el polipéptido, pero los estudios “*in silico*” e “*in vitro*” realizados, sugieren que la repercusión de una simple mutación puede ser ocasionalmente más compleja. Algunos cambios de aminoácidos (por ejemplo: p.Ser65Thr, p.Gly183Ser, p.Lys213Asn, o p.Met267Ile) pueden alterar el patrón normal de ajuste alternativo del RNA mensajero inmaduro. (Lai, et al., 2003). Del mismo modo, mutaciones en regiones intrónicas como c.639 + 861C > T y c.639 + 919G >A pueden dar lugar patrones de ajuste patológicos que disminuyen la cantidad de α -galactosidasa A (Filoni, et al., 2008, Ishii, et al., 2002).

El ajuste alternativo o “splicing” es el proceso mediante el cual se madura el transcrito primario obtenido a partir de la expresión de un gen, eliminando las regiones intrónicas, para obtener distintas moléculas de RNA mensajero. Con lo cual a partir de la expresión de un mismo gen se pueden obtener diferentes isoformas de una misma proteína. (Black, 2003). Han sido reconocidos 5 modelos básicos de ajuste alternativo:

- El salto de exón o exón “cassette”; en el que el exón puede ser expulsado o retenido (Sammeth, et al., 2008).
- Exones mutuamente exclusivos; en los que uno de los dos exones se retiene en el empalme después del ajuste.
- Sitio donador alternativo; se genera una junta alternativa de ajuste en el extremo 5' del intrón (sitio donador) cambiando el sitio de enlace en la región 3' del exón.
- Sitio aceptor alternativo; se genera una junta alternativa de ajuste en 3' (sitio aceptor) cambiando el sitio del enlace en la zona 5' del exón.

-Retención de intrón; en la que una secuencia puede ser retenida o expulsada. La diferencia con el salto de exón es que la secuencia retenida no está flanqueada por regiones intrónicas.

Cuando el precursor del RNA mensajero es transcrito desde el DNA este incluye varios exones e intrones. El mecanismo de ajuste es el que determina que exones deben quedar retenidos en el RNA mensajero. Los intrones tienen unas regiones consenso donde se produce el fenómeno de ajuste. Por regla general, cada intrón contiene en su extremo 5' las bases GU (guanina, uracilo). Cercano al extremo 3' está el sitio de ramificación. El nucleótido en el sitio de ramificación siempre es una adenina flanqueada por una secuencia consenso (Gao, et al., 2008). El sitio de ramificación casi siempre termina con la combinación AG (adenina, guanina) en 3' (Matlin, et al., 2005). El ajuste es llevado a cabo por un conjunto de ribonucleoproteínas llamado "spliceosoma" (van der Feltz, et al., 2012) (Figura 1.4)

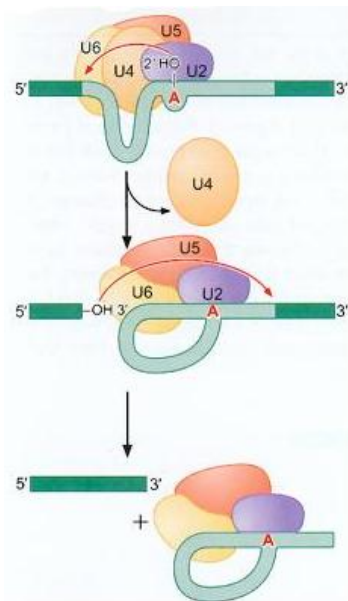


Figura 1.4: Mecanismo de ajuste general: El Spliceosoma cataliza la reacción de ajuste mediante la unión a la adenina del sitio de ramificación. Se producen dos reacciones de transesterificación. En la primera el extremo 5' del intrón es liberado para unirse a la adenina del sitio de ramificación generando una estructura en forma de lazo; en la segunda reacción el extremo 3' es liberado y los dos exones son unidos mediante un enlace fosfodiéster. El intrón es liberado y puede actuar en mecanismos de regulación génica o ser degradado.

En la tabla 1.1 se muestran los polimorfismos y variantes no patológicas encontradas en el gen *GLA*. Un polimorfismo es una variación en un lugar determinado de la secuencia entre los individuos de una población. Para que verdaderamente pueda considerarse un polimorfismo, la variación debe aparecer en al menos el 1% de la

INTRODUCCIÓN

población. Se cree que algunas de estas variantes podrían afectar la expresión del gen o alterar la actividad catalítica de la enzima “*in vitro*”, sin embargo, hasta la fecha no se han aportado datos consistentes sobre el posible efecto causante de la enfermedad producida por la herencia de esas variantes solas o en combinación.

Tabla 1.1: Polimorfismos del gen GLA humano. (* Existe controversia entre mutación y polimorfismo (Eng, et al., 1993, Yasuda, et al., 2003).

Posición	Cambio de nucleótido	Cambio de aminoácido
5'-UTR	c.-30G >A	
	c.-12G >A	
	c.-10C > T	
Exón 2	c.305C > T	p.Ser102Leu
	c.369T > C	p.=
Intrón 2	c.370-77_81del5	
Exón 3	c.376A >G	p.Ser126Gly
Intrón 4	c.639 + 68A >G	
	c.640-201del6	
	c.640-146T > C	
	c.640-16A >G	
Exón 6	c.937G > T	*p.Asp313Tyr
Intrón 6	c.1000-22C > T	
Exón 7	c.1187T >A	p.Phe396Tyr

1.3.2 Correlación genotipo-fenotipo

El análisis de la correlación genotipo-fenotipo es complicado en la EF debido a varios factores:

- 1- La mayoría de las mutaciones en este gen son “privadas”. Es decir, el número de portadores de la misma mutación es limitado.
- 2- La variabilidad fenotípica dentro de una misma familia, portadora de una misma mutación, es muy alta.
- 3- La sintomatología clínica es variable y se observa en otras entidades más frecuentes que afectan a la población general, haciendo difícil la asociación fenotípica exclusiva de la EF con el genotipo del gen *GLA*.
- 4- En los estadios avanzados de la enfermedad, el fenotipo no está correlacionado con las mutaciones en *GLA*.

Consecuentemente es difícil establecer con firmeza una correlación genotipo-fenotipo estudiada en familias o en casos índice. En general, el fenotipo clásico se asocia a mutaciones que desestabilizan o anulan la función de la proteína mientras que mutaciones que están alejadas del centro activo o desestabilizan la expresión del gen, pero mantienen una actividad residual alta, están asociadas a un fenotipo de desarrollo más lento de la enfermedad, este se conoce como “El fenotipo tardío”.

1.3.3 Correlaciones epigenéticas entre genotipo-fenotipo

La epigenética fue definida originalmente por Conrad Hal Waddington en 1942 como “el estudio de cómo los genotipos dan lugar a los fenotipos a través de cambios programados durante el desarrollo” (Waddington, 2012). La definición actual, refiere a la epigenética como los cambios estables y heredables en la actividad y expresión de los genes, y aquellas alteraciones a largo plazo en el potencial de la transcripción de una célula que no necesariamente son hereditarias. Según la definición actual, un evento epigenético es algo que afecta a los genes sin cambiar la secuencia de nucleótidos, de manera que puede ser heredado a través de la división celular y, eventualmente, en la formación de los gametos. En ese sentido, la epigenética puede incluir aquellos mecanismos involucrados en la implementación del programa genético en diferentes procesos que tienen lugar durante la vida útil de la célula.

INTRODUCCIÓN

como: el desarrollo, la diferenciación, la respuesta al estrés o a otras condiciones patológicas y al entorno con el fin de adaptarse a esas variaciones (Holliday, 2006, Rakyan and Beck, 2006, Whitelaw and Whitelaw, 2006). Los mecanismos epigenéticos incluyen la modificación química covalente del DNA (metilación de bases) o de la cromatina (modificaciones covalentes de histonas) y RNAs no codificantes, que se encuentran relacionados con la regulación de la expresión génica y la estructura de la cromatina (Bird, 2002, Feinberg, 2007, Umlauf, et al., 2008).

La metilación del DNA es la modificación epigenética más conocida (figura 1.5). En los mamíferos, consiste en la adición de un grupo metilo al anillo aromático de una base nitrogenada del DNA, principalmente en citosinas que preceden a guaninas para dar lugar a 5-metilcitosina.

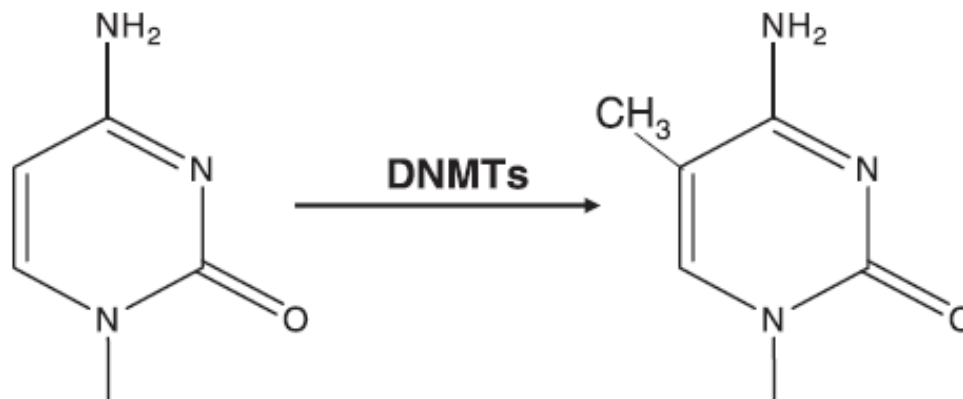


Figura 1.5: Metilación del DNA mediante la acción de las DNA metiltransferasas (DNMTs).

Los lugares donde suele tener lugar la metilación se conocen como dinucleótidos CpGs (Herman and Baylin, 2003). En el genoma humano, los CpGs se encuentran asimétricamente distribuidos como regiones de baja densidad en CpG y zonas de alta densidad de CpG. Estas últimas se denominan “islas CpG” y se localizan preferentemente en las regiones promotoras de aproximadamente la mitad de nuestros genes. La metilación del DNA es un proceso dinámico que tiene lugar durante el desarrollo en los organismos multicelulares para garantizar el mantenimiento del patrón normal de expresión. Pero también se refiere a la “impronta genómica”, donde el DNA metilado está silenciado, ya sea el alelo materno o paterno, para garantizar una expresión monoalélica (Kacem and Feil, 2009). De un modo similar, la reducción de la dosis-gen implicado en la inactivación

del cromosoma X en las mujeres (Payer and Lee, 2008). La metilación del DNA en la citosina se asocia con el silenciamiento de genes, siendo el mecanismo por el cual tiene lugar la represión de la transcripción a través de una estructura “cerrada” de la cromatina.

La familia conocida como DNMTs, es el sistema enzimático responsable de la metilación del DNA, y cataliza tanto los procesos de metilación “*de novo*”, como el mantenimiento del DNA hemimetilado que se forma tras el proceso de replicación (Cheng and Blumenthal, 2008). Los patrones de metilación serán establecidos por, al menos, tres DNA metiltransferasas diferentes, DNMT1, DNMT3a y DNMT3b, que catalizan la transferencia del grupo metilo desde el donador de dicho grupo, la S-adenosil-I-metionina (SAM) hacia las citosinas del DNA, las cuales se encuentran restringidas a aquellas regiones CG simétricas en la mayoría de los mamíferos.

Los cambios en la histona tienen un mecanismo epigenético más complejo. El nucleosoma es la unidad de repetición fundamental de la cromatina, está constituido por un octámero de proteínas que contiene dos copias de cada una de las histonas H2A, H2B, H3 y H4, que son de pequeño tamaño y muy básicas, junto con un fragmento de 147 pb de DNA que las envuelve. Una de las principales funciones de las modificaciones en las histonas que componen la cromatina es la de actuar como factor “arquitectónico”. La cromatina con un estado de condensación bajo (eucromatina) es más accesible a los factores de transcripción, mientras que la cromatina con un estado alto de compactación (heterocromatina), impide la transcripción de los genes. Las histonas presentan una cola amino-terminal que sobresale del octámero constituido por el DNA y las proteínas, lo que las hace más susceptible a experimentar modificaciones en los residuos aminoacídicos (Kouzarides, 2007). La interacción entre las histonas modificadas y el DNA, pueden regular muchos acontecimientos biológicos entre los que destacan la expresión de genes, la reparación del DNA, compactación de la cromatina y estabilidad genómica, además de importantes procesos genéticos como la inactivación del cromosoma X (Feinberg, 2007). La acetilación de las histonas es la modificación más ampliamente estudiada y se asocia a una transcripción activa del gen (Allfrey, et al., 1964). Esta modificación es llevada a cabo por el complejo enzimático conocido como HATs (enzimas histona acetiltransferasas) (figura 1.6), que acetilan residuos de lisina

INTRODUCCIÓN

específicos en las histonas (acetilación de las lisinas 14 ó 19 en la histona H3 y lisina 16 de la histona H4) y cuyo efecto puede ser revertido por la acción de las HDACs, (histona deacetilasas).

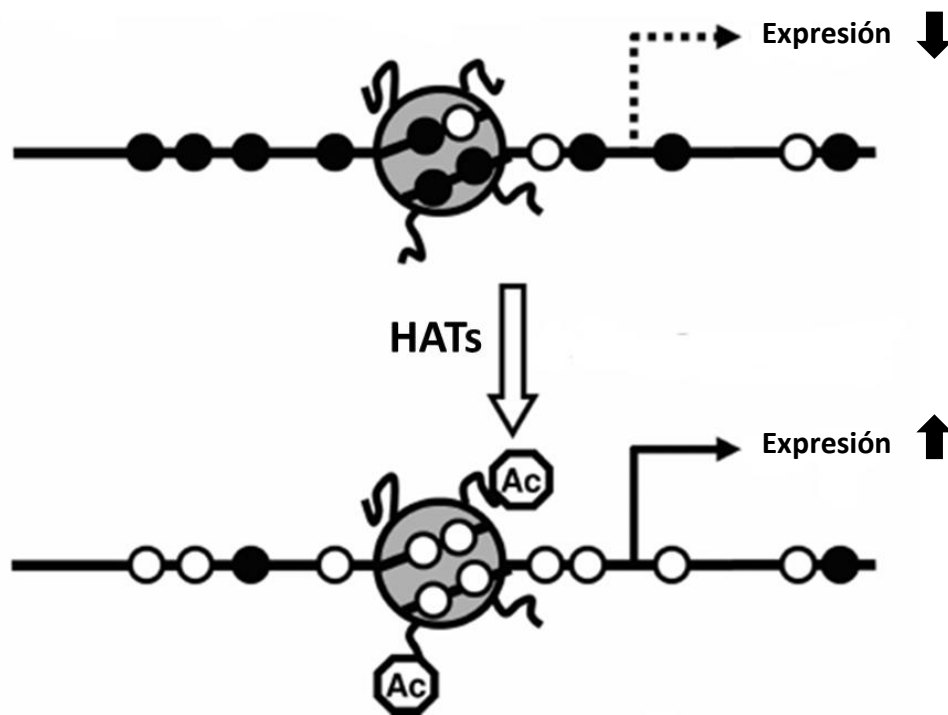


Figura 1.6: Acetilación de histonas mediante los complejos enzimas histona acetiltransferasas (HATs).

La metilación del DNA y la modificación de histonas son fenómenos interrelacionados en la regulación de genes.

Actualmente existen fármacos aprobados para su uso clínico que utilizan como dianas terapéuticas a las metiltransferasas de DNA y a las desacetilasas de histonas. Los inhibidores de las metiltransferasas de DNA (DNMTi) o bien interfieren en el centro activo de la enzima o detienen el ciclo catalítico en una etapa determinada mediante la formación irreversible de un intermedio covalente. Los inhibidores covalentes han sido los más desarrollados hasta la fecha. La enzima queda bloqueada ya que al incorporar al DNA estos sustratos, impiden completar el ciclo catalítico, quedando bloqueada irreversiblemente la enzima. Los dos DNMTi aprobados hasta la fecha son la 5-aza-2'-deoxicitidina (Decitabina, DacogenTM) y la 5-azacitidina (AzaC, Azacitidina, VidazaTM).

El efecto de algunos factores ambientales sobre el estado epigenético de organismos adultos ha sido ampliamente descrito (Feinberg, et al., 2006). Los organismos superiores se componen de múltiples tejidos y como el estado epigenético es específico de cada célula o tejido, los efectos ambientales sobre el epigenotipo de un organismo pueden depender del tipo del tejido (por ejemplo el estado epigenético específico de un tejido, le permite ser más resistente a las alteraciones epigenéticas inducidas por el entorno). El grado de exposición de un tejido a un factor ambiental específico puede también determinar su habilidad para inducir modificaciones epigenéticas específicas dentro de éste.

Investigaciones recientes sobre los modificadores genéticos como los efectores epigenéticos para signos específicos en la población normal y que son comunes entre pacientes con EF han mostrado correlaciones que podrían ser predictivas (Barbaro-Romero, et al., 2010). Es decir que hay un valor en la determinación y evaluación de los modificadores epigenéticos que puede influir en el fenotipo de EF. Sin embargo, lo que es más interesante es la posibilidad de que el efecto de estos genes modificadores no sea exactamente lo que se ve en la población normal, es decir, puede haber un efecto diferencial en la enfermedad de Fabry que no es necesariamente equivalente a lo que podría predecirse a partir de otras poblaciones (Altatrescu, 2010).

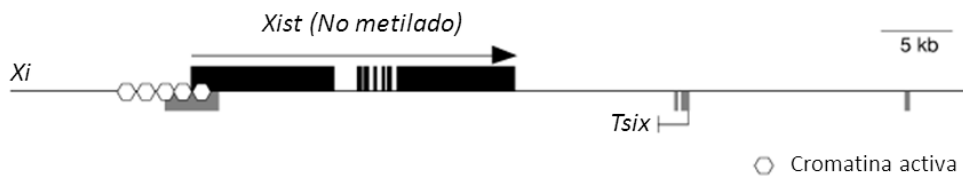
1.3.4 Bases genéticas y moleculares de la EF en mujeres

En las enfermedades ligadas al cromosoma X, las mujeres heterocigotas son comúnmente llamadas portadoras. Este término únicamente se refiere a que se transmite información del genotipo pero no del fenotipo. A diferencia de otras enfermedades en las que las mujeres portadoras no desarrollan síntomas de la enfermedad, en la EF estas pueden no desarrollar síntomas o pueden desarrollarlos variando desde fenotipos leves a fenotipos graves, al igual que los varones. En general el desarrollo de la enfermedad en mujeres es tardío y el fenotipo tiende a ser más suave que en varones. Esto puede ser debido al silenciamiento del cromosoma X. Lyon hipotetizó que, durante el desarrollo embrionario temprano en las mujeres, uno de los dos cromosomas es inactivado de forma aleatoria, dejando al otro con toda la información genética activa (Lyon, 1961). En la inactivación, el cromosoma X,

INTRODUCCIÓN

paterno o materno se encuentran inactivados de forma aleatoria. El proceso implica varios mecanismos epigenéticos, incluyendo el silenciamiento de genes mediante RNA no codificante (Xist RNA), metilación del DNA y cambios en la composición y estructura de la cromatina. El RNA no codificante Xist es sintetizado únicamente por el cromosoma X inactivo (Xi), al cual bloquea. Tsix es el gen con función opuesta a la de Xist y también participa en la inactivación. El cromosoma Xi es bloqueado por el RNA no codificante Xist para impedir la expresión de Tsix, mientras que en el cromosoma X activo (Xa), el RNA resultante de la expresión del gen Tsix, bloquea la transcripción del gen Xist y la inactivación del cromosoma X mediada por este gen se encontrará bloqueada. Además, el cromosoma Xi se encontrará hipermetilado en las islas CpG y en las regiones promotoras de sus genes, presenta también hipoacetilación de la histona H4 y el gen Xist se encontrará sin metilar; mientras que en cromosoma Xa este gen se encontrará hipermetilado, lo que permite su expresión exclusivamente en el cromosoma Xi (Jeon, et al., 2012) (figura 1.7).

A



B

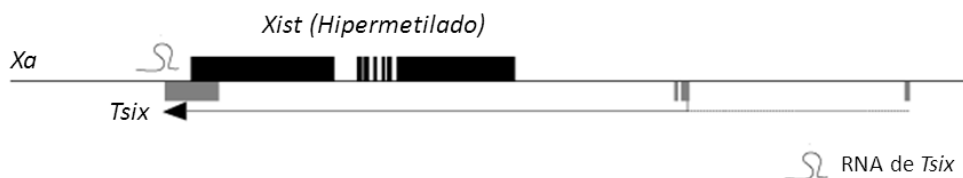


Figura 1.7: Mecanismos de inactivación del cromosoma X. A) La expresión del gen Xist impide que se exprese Tsix inactivando al cromosoma X (Xi cromosoma inactivo). B) La expresión de Tsix bloquea a Xist dejando al cromosoma activo (Xa cromosoma activo).

Este efecto queda a la vista en la aparición del color naranja en los gatos. El color naranja en los gatos está codificado en el gen *O-o* ubicado en el cromosoma X. Con lo cual un gato hembra heterocigoto para ese color, dependiendo del patrón de inactivación, presentará un patrón en forma de mosaico con unas zonas u otras de color naranja (Schmidt-Kuntzel, et al., 2009) (figura 1.8).

Ese efecto extrapolado a la EF en la mujer, significa que el *Xa* portador de la mutación genética en la mayoría de las células de una mujer heterocigota, desarrollaría la enfermedad y el fenotipo dependería del grado de activación de ese cromosoma mutado a nivel de los tejidos.



Figura 1.8: Patrón de expresión del color naranja ligado al cromosoma X en gatos.

1.4 Bases patológicas de la EF

La EF es causada por el acúmulo de grandes cantidades de una clase de lípidos complejos llamados esfingolípidos (figura 1.9). Estos lípidos derivan del aminoalcohol etilénico de 18 carbonos, esfingosina. La esfingosina se halla unida a un ácido graso de cadena larga mediante un enlace amida formando la ceramida. Unida al grupo hidroxilo 1 de la ceramida mediante enlace glucosídico, se une un oligosacárido formando los glucoesfingolípidos. En los pacientes de EF el

INTRODUCCIÓN

glucoesfingolípido acumulado mayoritario es la globotriaosilceramida (Gb_3), llamada previamente ceramida trihexósido (CTH) (figura 1.9) (Sweeley and Klionsky, 1963). Este glucolípido es llamado también antígeno pk de los grupos sanguíneos p (Schenkel-Brunner, 2000) y CD77. Otras sustancias acumuladas son la galabiosilceramida, presente mayoritariamente en riñón y la globotriaosilesfingosina (liso- Gb_3) (figura 1.9) (Aerts, et al., 2008). Basándose en los descubrimientos de los defectos enzimáticos en la enfermedad de Gaucher (EG) (Brady, et al., 1965) y la enfermedad de Niemann-Pick A/B (Brady, et al., 1966) se predijo que el defecto enzimático en la EF era debido a una actividad deficiente de la enzima que cataliza la hidrólisis de la galactosa terminal de la Gb_3 , la α -galactosidasa A (Brady, 1966).

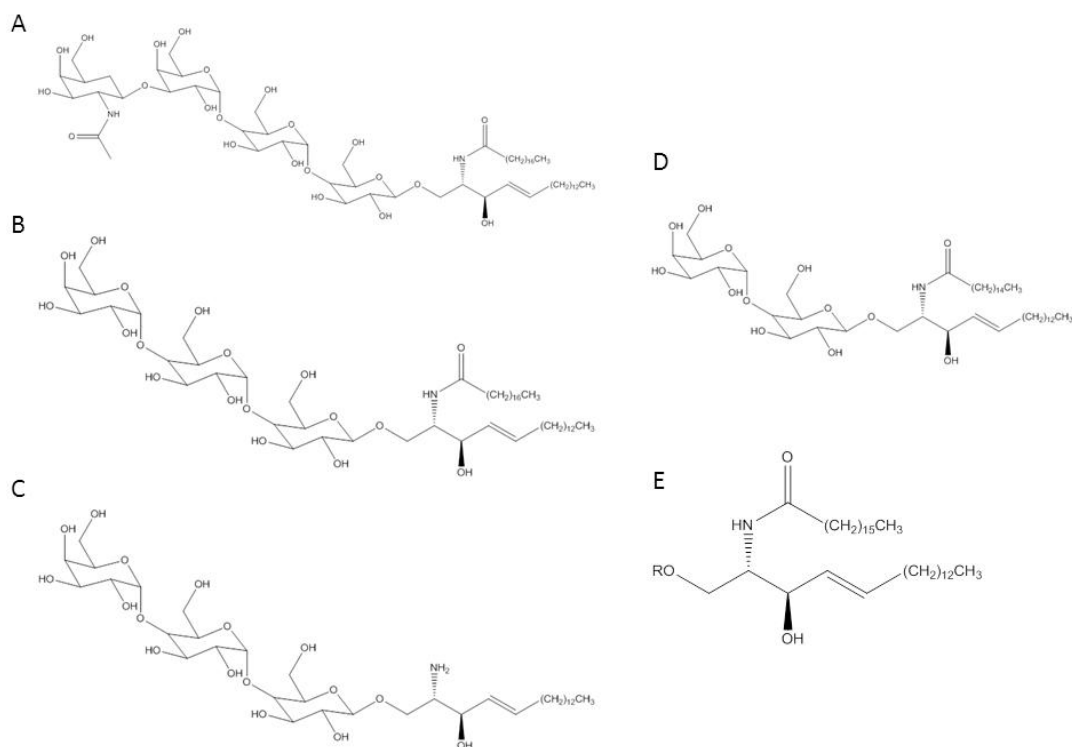


Figura 1.9: Diferentes tipos de esfingolípidos y precursor A) Gb_4 , B) Gb_3 , C) Liso- Gb_3 , D) Lactosilceramida, E) Esfingolípido.

1.5 Fisiopatología de la EF

Los glucoesfingolípidos son moléculas que se encuentran en las membranas plasmáticas de la mayoría de las células de todos los tejidos en el organismo. Sin embargo el recambio de glóbulos rojos se erige como la mayor fuente de glucoesfingolípidos que contribuye al desarrollo de la EF. Excepto en las personas con grupos sanguíneos pk y p, el principal glucoesfingolípido del estroma del eritrocito es la globotetraosilceramida (Gb₄), también llamada globósido (figura 1.9). Cuando las células rojas se vuelven senescentes son retiradas del organismo por los macrófagos, como las células de Kupffer en el hígado. Todos los componentes de la membrana de las células fagocitadas son degradados enzimáticamente en el lisosoma. Los lisosomas contienen enzimas capaces de catalizar la degradación de los componentes celulares a pH ácido. El catabolismo de los globósidos de las membranas de los eritrocitos se inicia con la formación de Gb₃ catalizada por la enzima hexosaminidasa B. Debido a la actividad insuficiente de α -galactosidasa A, se acumulan cantidades patológicas de Gb₃ en todo el organismo de los pacientes con EF. La importancia de la fuente constante de glucoesfingolípidos procedente del estroma de los eritrocitos senescentes fue confirmada en experimentos con el modelo en ratón de EF. En este ratón deficiente en α -galactosidasa A se produce un acúmulo significativo de Gb₃ en los órganos (Ohshima, et al., 1997).

1.6 Estructura de la α -galactosidasa A humana

La estructura de la α -galactosidasa A humana fue determinada mediante cristalografía de rayos X en el año 2004 (Garman and Garboczi, 2004). La estructura cristalina mostró una molécula homodimérica en la que cada monómero contiene dos dominios. El dominio N-terminal es un barril (β/α)₈ y el dominio C-terminal contiene 8 hebras β antiparalelas empaquetadas formando un dominio de tipo sándwich β (figura 1.10).

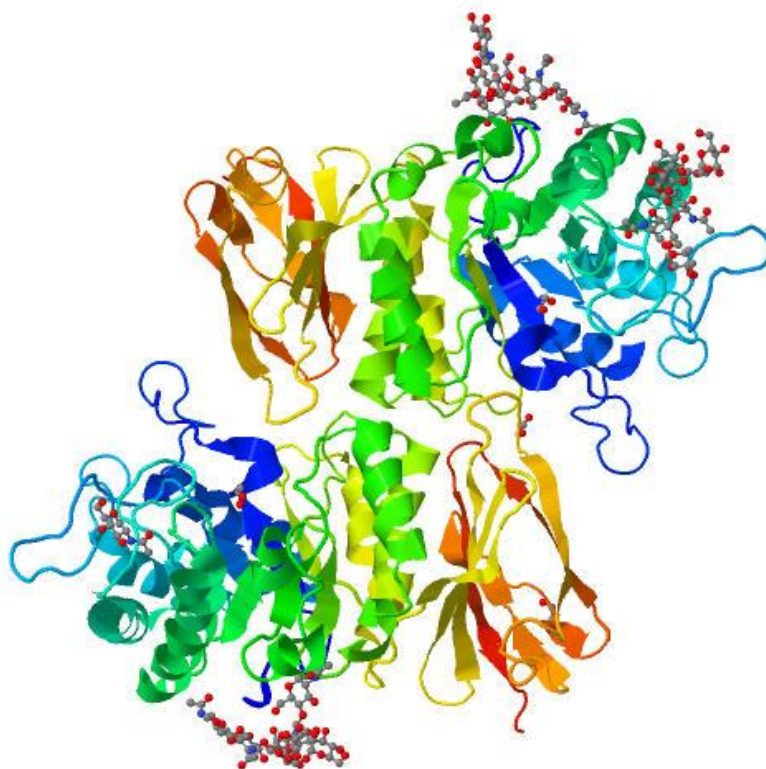


Figura 1.10: Visión general de la estructura de la α -galactosidasa A humana (Fuente: PDB. Protein Data Bank <http://www.rcsb.org/pdb>. Autores: Garman, S.C, Gaborci, D.N).

El dominio N-terminal está comprendido entre los residuos 32 al 328 y el dominio antiparalelo C-terminal entre los residuos 329 al 421. El dominio N-terminal contiene el centro activo de la enzima el cual está colocado al final del dominio C-terminal en las hebras β (β 1- β 7) al lado del centro del barril β . En la superficie de la molécula se encuentran tres carbohidratos N-glicosilados unidos a los residuos de ácido aspártico N139, N192 y N215. El centro activo de la molécula (figura 1.11)

está formado por las cadenas laterales de los residuos W47, D92, D93, Y134, C142, K168, D170, C172, E203, L206, Y207, R227, D231, D266 y M267. Los residuos C142 y C172 forman un puente disulfuro. Los dos centros activos en el dímero están separados a una distancia aproximada de 50 Å (Guce and Garman, 2010).

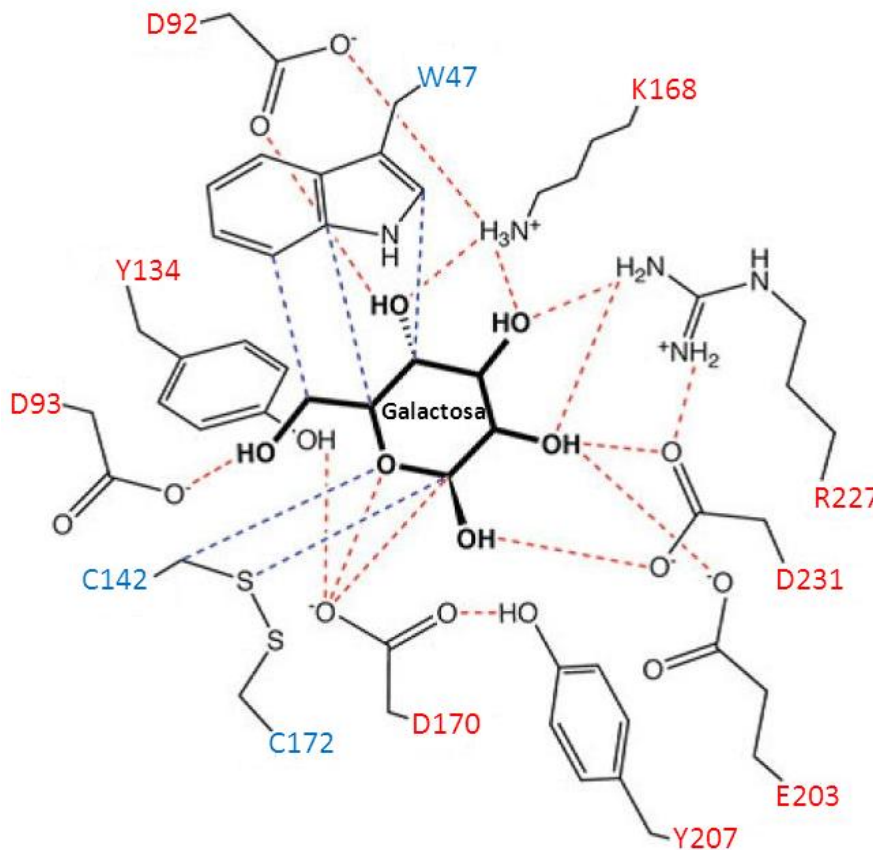


Figura 1.11: Centro activo de la enzima. En azul están representadas las interacciones de van der Waals y en rojo los puentes de hidrógeno con el ligando de α -galactosa. Imagen adaptada de: (Guce and Garman, 2010).

La α -galactosidasa A usa un mecanismo de reacción de doble desplazamiento (figura 1.12), donde se producen dos ataques nucleófilos consecutivos en el carbono anomérico del sustrato, rompiendo el enlace glucosídico con la retención global del carbono anomérico del producto. En la α -galactosidasa A, el catalizador nucleófilo es el residuo D170 y la catálisis ácido/base está producida por el residuo D231 (Guce, et al., 2010).

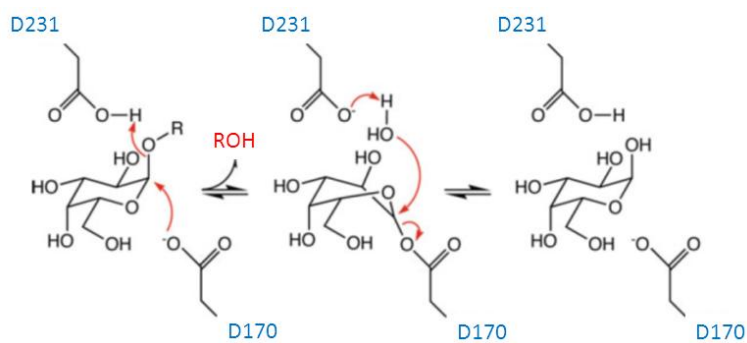


Figura 1.12: Mecanismo catalítico de la enzima Imagen adaptada de: (Guce and Garman, 2010).

1.7 Manifestaciones clínicas de la EF

1.7.1 Síntomas tempranos de la EF

Los síntomas tempranos de la EF son experimentados generalmente antes en los varones que en las mujeres (Hopkin, et al., 2008). El dolor es experimentado entre el 60-80% de los varones y mujeres jóvenes afectadas (Hoffmann, et al., 2007) y es uno de los síntomas más tempranos de la enfermedad. Se han descrito dos tipos de dolor: crisis episódicas “Crisis de Fabry”, caracterizadas por dolor ardiente en brotes originado en las zonas distales de las extremidades que se irradia hacia otras partes del cuerpo y el dolor crónico caracterizado por parestesias ardientes y hormigueos de menor intensidad pero constantes (Charrow, 2009). Las crisis de Fabry pueden ser precipitadas por la fiebre, el ejercicio, el estrés y el cambio drástico de temperaturas (Hilz, et al., 2000). Como consecuencia del dolor, los pacientes de EF experimentan un malestar constante y tienen una calidad de vida muy deficiente. Otros síntomas de aparición temprana y que perduran en la edad adulta son las manifestaciones gastrointestinales, que aunque son comunes, suelen pasar desapercibidas o suelen ser poco valoradas (Sheth, et al., 1981). Los pacientes pueden presentar dolor abdominal (normalmente después de comer), diarrea, náuseas y vómitos. Los síntomas gastrointestinales pueden estar relacionados con el depósito de Gb₃ en el sistema nervioso entérico y en los vasos sanguíneos del mesenterio (Eng, et al., 2006).

Otro síntoma característico es la ausencia de sudoración (anhidrosis) (Kang, et al., 1987) o la disminución de la misma (hipohidrosis) (Orteu, et al., 2007) junto con el descenso de la elasticidad de la piel (Gupta, et al., 2008), es un problema que causa intolerancia al calor (Shelley, et al., 1995) y al ejercicio (Eng, et al., 2006).

Un signo visible y precoz es el angioqueratoma (pequeñas dilataciones vasculares cutáneas) y los agrupamientos en forma de pequeñas pápulas de color rojo vinoso (figura 1.13) típicamente ubicadas en la zona de las nalgas, zona inguinal y ombligo.



Figura 1.13: Angioqueratoma: Los angioqueratomas son lesiones vasculares caracterizadas por dilataciones de los vasos sanguíneos de la dermis papilar con cambios epidérmicos secundarios, como acantosis y/o hiperqueratosis típicamente encontrados en la parte baja de la espalda, ombligo, zona de las nalgas y parte alta de los muslos. (Autor: Pilar Giraldo Castellano).

Histológicamente, las lesiones dérmicas son angiomas pequeños superficiales causados por el daño acumulativo vascular de las células endoteliales de la piel con dilatación de los vasos en la dermis que pueden incrementar en número y tamaño con la edad (Orteu, et al., 2007).

Es frecuente encontrar cambios en la córnea producidos por los depósitos de material glucolipídico no degradado (“*cornea vercillata*”) (figura 1.17). Se pueden observar vasos tortuosos en la retina.

También se puede ver afectado el aparato auditivo y provocar hipoacusia, el tinnitus puede ser un síntoma temprano y ha sido descrito en niños (Keilmann, et al., 2009).

Estos síntomas solos o en combinación pueden causar una alta morbilidad limitando socialmente al paciente en buena medida. Los síntomas tempranos de la EF están resumidos en la tabla 1.2.

INTRODUCCIÓN

Las disfunciones cardíacas y cerebrovasculares se presentan durante la adolescencia en los dos sexos. La disfunción renal cursa con microalbuminuria y proteinuria. Esta suele aparecer en la segunda década de la vida.

Tabla 1.2: Síntomas tempranos en la EF.

Órgano, Tejido	Síntoma
Sistema nervioso	Acroparestesias
	Sordera nerviosa, tinnitus
	Intolerancia al calor
	Intolerancia al ejercicio
Tracto gastrointestinal	Nauseas, vómitos, diarrea
	Saciedad temprana, dolor postprandial
	Crisis de dolor abdominal
Piel	Angioqueratomas
	Hipohidrosis
Ojos	Opacidad corneal y lenticular
	Vasculopatía (retina, conjuntiva)
Riñones	Microalbuminuria
	Defecto de filtración glomerular
	Excreción urinaria aumentada de Gb ₃
Corazón	Arritmia
	Hipertrofia ventricular por depósito
	Insuficiencia valvular

1.7.2 Afectación renal

La afectación renal es bastante común en la EF produciendo a largo plazo insuficiencia renal crónica. Los depósitos de glucoesfingolípidos se pueden encontrar en los podocitos, mesangio, el epitelio tubular distal, endotelio vascular y las células musculares lisas del endotelio (Gubler, et al., 1978) (figura 1.14).

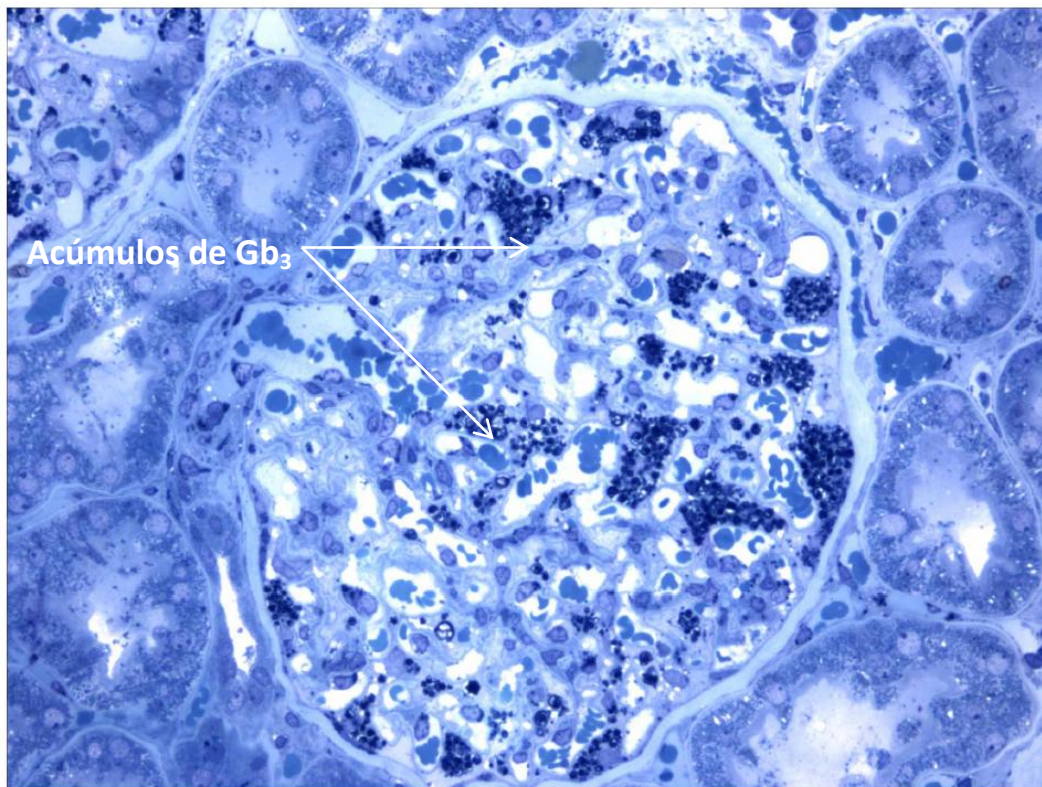


Figura 1.14: Biopsia de riñón en un paciente con EF (Microscopía óptica): Los acúmulos (en azul oscuro) son más prominentes en los podocitos donde el acúmulo de Gb₃ es mayor. Imagen adaptada de: (Germain, 2010).

La fase inicial de la afectación renal está caracterizada por la aparición de microalbuminuria, la cual incrementa cuantitativamente con el progreso de la enfermedad. El mesangio ensanchado, la destrucción de los glomérulos y su remplazo por tejido fibrótico conducen a la glomerulosclerosis y finalmente a la insuficiencia renal. El acúmulo de glucoesfingolípidos, especialmente Gb₃, produce fibrosis que se refleja en las pruebas de la función renal como isostenuria o la poliuria y la incapacidad de concentrar la orina por los riñones. Si los túbulos están afectados mayoritariamente, el análisis urinario muestra aminoaciduria, glucosuria y acidosis tubular renal. La evaluación de la función renal incluye la creatinina en

INTRODUCCIÓN

suero, cistatina C, estimación de la tasa de filtrado glomerular (GFR), proteína total, excreción de (micro) albúmina y la excreción urinaria de sodio (Froissart, et al., 2007). La albuminuria o la proteinuria suele ser detectada en varones hemicigotos en la segunda o tercera década de la vida. La degeneración progresiva de la función renal es típica de la cuarta y la quinta década. La hipertensión renal es una manifestación frecuente (Meroni, et al., 1997).

1.7.3 Afectación cardíaca

Alrededor del 40-60% de los pacientes con EF tienen síntomas cardiacos como la hipertrofia ventricular izquierda (HVI), arritmia, ángor y disnea (Schiffmann, et al., 2009). La disfunción diastólica y la HVI concéntrica, son rasgos presentes en la EF. Las anomalías estructurales del ventrículo izquierdo pueden ser demostradas mediante la ecocardiografía (figura 1.15) o la resonancia magnética (RMI) (figura 1.16). La hipertrofia concéntrica es el cambio estructural más común (Linhart, et al., 2000).



Figura 1.15: Ecocardiografía: Vista paraesternal eje corto mostrando HVI. Imagen adaptada de:(Germain, 2010).

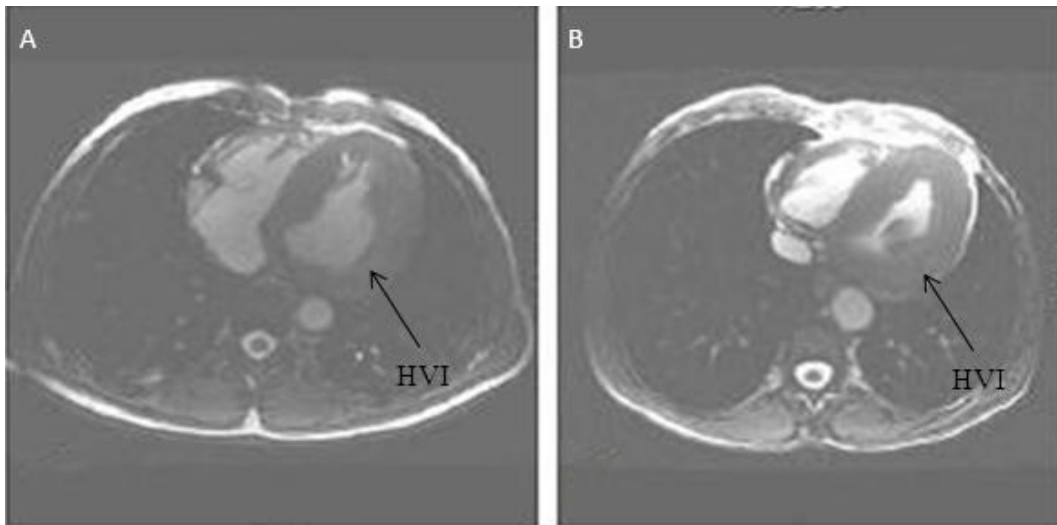


Figura 1.16: RMI cardiaca para la valoración de HVI y fibrosis: A) HVI en paciente de 51 años con afectación cerebrovascular e insuficiencia renal. B) Cardiomiopatía hipertrófica en un paciente de 51 años de edad con arritmia y trasplante renal. Imágenes adaptadas de : (Germain, 2010).

Los cambios electrocardiográficos son frecuentes en los pacientes, encontrando signos de HVI por criterios de voltaje y cambios en la repolarización (Sheth and Thomas, 1982). La isquemia de miocardio y el infarto pueden ser debidos al compromiso de la función de la red vascular coronaria (Elliott, et al., 2006). Con la edad se desarrolla fibrosis intersticial que va desplazando progresivamente al miocardio (Hasegawa, et al., 2006) y en los estadios finales de la enfermedad, la fibrosis es tan intensa que se reduce la función cardiaca gradualmente hasta que se produce la insuficiencia cardiaca. (Takenaka, et al., 2008). Las arritmias malignas son las responsables de un gran número de muertes en pacientes afectados por EF (Takenaka, et al., 2008).

1.7.4 Afectación cerebrovascular

La neuropatía periférica temprana suele estar seguida de complicaciones cerebrovasculares y disfunciones autonómicas en la edad adulta. Algunos de los rasgos neurológicos más devastadores de la EF están causados por lesiones cerebrovasculares, resultado de la implicación multifocal de los pequeños vasos sanguíneos (Fellgiebel, et al., 2006). La afectación cerebrovascular puede llevar a una amplia variedad de síntomas desde un grado moderado a grave, incluyendo:

Cefalea, vértigos, isquemia cerebral transitoria e ictus (Sims, et al., 2009). Según los datos del “Fabry Registry[®]”, la prevalencia de ictus en la EF está estimada en el 6,9% de los hombres y el 4,3% en las mujeres. Esta prevalencia es superior a la de la población general de la misma edad. Datos del “Fabry Registry[®]” (Eng, et al., 2006) y del “Fabry Outcome Survey[®] (FOS)” (Fellgiebel, et al., 2006), han demostrado que la mayoría de los episodios de ictus en la EF están producidos por eventos trombóticos en los pequeños vasos. La formación del trombo en la EF puede estar potenciada por la adhesión de neutrófilos y monocitos a las paredes endoteliales (DeGraba, et al., 2000) o a los cambios en la hiperperfusión cerebral (Moore, et al., 2001).

1.7.5 Trastornos auditivos y vestibulares

Los trastornos auditivos y vestibulares son frecuentes en EF, resultando en una variedad de síntomas como la pérdida auditiva (Germain, et al., 2002), tinnitus y vértigo. Se ha descrito una mayor incidencia de hipoacusia y sordera súbita en pacientes con fenotipo clásico de EF (Desnick, et al., 2003). Se ha encontrado una correlación entre la afectación neuropática y el daño vascular con la pérdida auditiva en varones en los que la actividad residual de la α -galactosidasa A tenía un efecto protector frente a la pérdida auditiva (Ries, et al., 2007). Otra observación importante es la pérdida vestibular progresiva en el 80% de los varones y en el 77% de las mujeres cuando se ha evaluado mediante la prueba de potenciales evocados (Palla, et al., 2007).

1.7.6 Trastornos oculares

Las opacidades corneales (visibles mediante microscopio de lámpara de hendidura) son los síntomas oculares más iniciales y frecuentes. Ocurren en la mayoría de varones hemicigotos (Orssaud, et al., 2003). Se observa también una tortuosidad en los vasos retinianos y conjuntivales. Con frecuencia aparecen también cataratas subcapsulares llamadas “Cataratas de Fabry” y representan un síntoma ocular patognomónico en la EF “córnea vercillata” (figura 1.17).

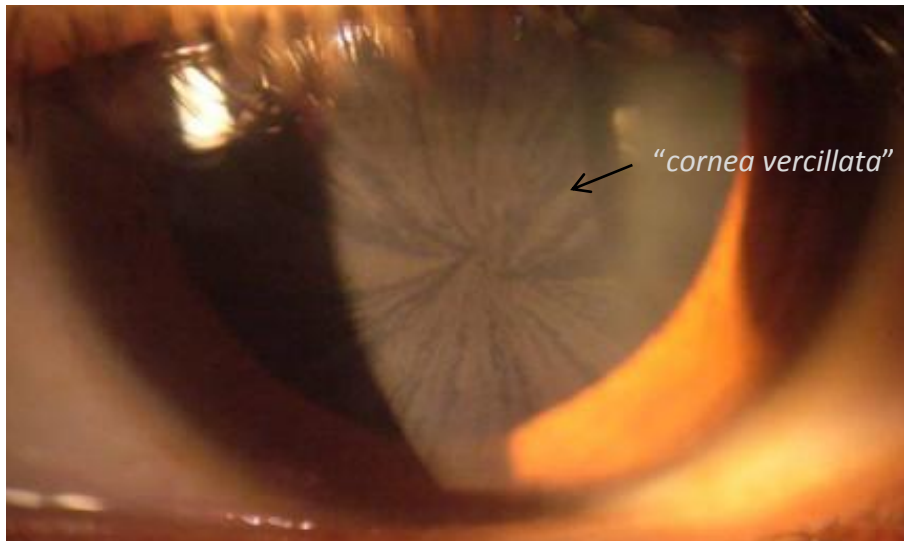


Figura 1.17: Córnea de una paciente heterocigota: las líneas marrones subepiteliales muestran el típico patrón llamado "*cornea vercillata*". Imagen adaptada de : (Germain, 2010)

1.7.7 Afectación respiratoria

La afectación respiratoria es frecuente en ambos sexos manifestándose como disnea con el ejercicio, tos crónica y ruidos respiratorios (Rosenberg, et al., 1980). Es frecuente encontrar obstrucción en los bronquios. En los casos graves, la infiltración de Gb₃ en la barrera alvéolo capilar y la pérdida de la elasticidad pulmonar debido a la infiltración intersticial, se materializa en una reducción de la capacidad y otros índices espirométricos.

1.7.8 Depresión y calidad de vida

La depresión es un síntoma frecuente y subdiagnosticado en la EF (Sadek, et al., 2004). Alrededor del 46% de los pacientes pueden desarrollar este cortejo sintomático (Cole, et al., 2007). También es un síntoma que enmascara la enfermedad, por ello se llama la enfermedad "simuladora". La EF presenta síntomas de enfermedades que son mucho más frecuentes entre la población y los pacientes pueden ser tratados de forma errónea por falta de identificación del problema. La depresión puede afectar seriamente a la calidad de vida de los pacientes y provocar situaciones de autolisis. En la evaluación de los pacientes con EF se recomienda la valoración neuropsicológica y psiquiátrica (Laney, et al., 2010, Segal, et al., 2010).

1.8 Diagnóstico

La edad de diagnóstico promedio en la EF para varones se encuentra en $25,7 \pm 15,3$ años mientras que para mujeres es de $31,3 \pm 17,4$ años, con un retraso promedio desde la aparición de los síntomas hasta el diagnóstico de aproximadamente 12 años para ambos sexos (Beck, 2006). Una vez que se tiene una sospecha de EF, el diagnóstico definitivo en varones debe realizarse con el análisis de la actividad de la α -galactosidasa A en una muestra de sangre, el cual puede ser llevado a cabo en muestras de células blancas, plasma/suero (Desnick, et al., 1973) o en gota de sangre seca (Chamoles, et al., 2001). La deficiencia enzimática puede ser demostrada en cultivo de fibroblastos, orina y otros tejidos (Desnick, et al., 2003). La confirmación del diagnóstico es llevada a cabo por la detección de la mutación causal en el gen *GLA*. Las mujeres heterocigotas no se pueden diagnosticar de forma fidedigna mediante el análisis de actividad enzimática en leucocitos y plasma, debido a la inactivación aleatoria del cromosoma X, ya que pueden tener niveles de actividad normales (Desnick, et al., 1973, Desnick, et al., 2003). El análisis mutacional es imprescindible para confirmar el diagnóstico de los pacientes heterocigotos (Winchester and Young, 2006). La detección y cuantificación de los productos de acúmulo; Gb₃ en plasma (Mills, et al., 2002) y orina (Boscaro, et al., 2002); liso-Gb₃ en plasma (Aerts, et al., 2008); pueden ser de gran ayuda como prueba que evidencia el diagnóstico y como marcador de seguimiento de la enfermedad. El desarrollo de la TES (Eng, et al., 2001, Schiffmann, et al., 2001) enfatizó la importancia del diagnóstico temprano incluso del cribado neonatal para la EF. Los métodos de cribado basados en el análisis de la actividad enzimática en gota de sangre seca (Mayes, et al., 1981) y de acúmulo de sustrato en orina recogida en papel de filtro (Auray-Blais, et al., 2007); han sido diseñados para realizar el cribado masivo y en poblaciones con alto riesgo de EF.

1.8.1 Diagnóstico enzimático

La actividad de la α -galactosidasa A se puede medir en muestras de suero/plasma y en leucocitos, mediante el uso del sustrato sintético, 4-metilumbeliferil- α -D-galactopiranosido a un pH de 4,6 (Desnick, et al., 1973, Winchester and Young, 2006). Para inhibir a la α -N-acetilgalactosaminidasa (llamada también α -galactosidasa B) se añade a la reacción N-acetilgalactosamina (Mayes, et al., 1981). Esta enzima es la responsable de más del 20% de la actividad total de la α -galactosidasa en el plasma y entre el 5-10% en leucocitos usando el sustrato sintético. Otros factores que afectan a la actividad son: el pH, la temperatura, los inhibidores endógenos, anticoagulantes y contaminación por eritrocitos. Todos esos factores se han tenido en cuenta a la hora de desarrollar el protocolo estándar y establecer los rangos de referencia. La hemoglobina liberada por los eritrocitos puede bloquear la fluorescencia emitida por el sustrato sintético. Las muestras lipémicas presentan otro problema potencial ya que los lípidos en suspensión pueden interferir con los reactivos de la reacción y afectar las medidas de fluorescencia. En el caso de medidas en leucocitos, la hemólisis en el proceso de obtención también puede ser un problema bloqueando la fluorescencia emitida por el sustrato.

Los pacientes varones con fenotipo clásico, generalmente, presentan una actividad en plasma/suero y leucocitos, baja o indetectable. El diagnóstico debe confirmarse por análisis mutacional. Los niveles de sustrato en plasma u orina están elevados en la mayoría de los pacientes y pueden utilizarse como soporte para el diagnóstico. Algunos pacientes con fenotipo clásico moderado tienen niveles residuales bajos de actividad enzimática. En pacientes con las formas atípicas de la enfermedad, que no muestran fenotipos clásicos, con síntomas tardíos, se suelen encontrar niveles de actividad residual altos (Desnick, et al., 2001, Ishii, et al., 2007, Winchester and Young, 2006) incluyendo las variantes cardíacas (Nakao, et al., 1995) y renales (Nakao, et al., 2003). Existen mutaciones particulares a las que están asociadas actividades residuales altas como: N215S, R301Q. Los pacientes varones con una presentación clínica atípica y actividad residual alta deben ser investigados a través de una caracterización de la actividad residual, secuenciación completa del gen *GLA* y medida de los productos de acúmulo en orina o plasma antes de establecer un diagnóstico definitivo. La actividad en mujeres afectadas varía desde los niveles

bajos encontrados en varones afectados hasta niveles dentro de la normalidad. Un 30% de las mujeres portadoras tiene actividad enzimática normal (Desnick, et al., 2001). Una actividad normal no tiene por qué contradecir una sospecha clínica en mujeres. Aunque muchos heterocigotos tienen una actividad baja en plasma/suero y leucocitos otros no se pueden detectar por métodos enzimáticos. La identificación de los portadores está basada en la detección de las mutaciones causantes de enfermedad en el gen *GLA*. Se asume que los niveles de actividad de la α -galactosidasa A en los leucocitos de los heterocigotos reflejan el patrón de inactivación del cromosoma X en las células de la muestra. La inactivación del cromosoma X, se propone como mayor factor determinante del desarrollo de la enfermedad en heterocigotos. Se encontraron diferencias significativas entre los valores de la puntuación de gravedad de la enfermedad y la inactivación del cromosoma X (Dobrovoly, et al., 2005) y se ha observado que en heterocigotos en edad avanzada, a veces se encuentran valores de actividad altos dentro del rango de los heterocigotos. Este efecto se atribuye a la reactivación del cromosoma X, no portador de la mutación, con la edad (Desnick, et al., 2001).

1.8.2 Análisis mutacional

Para identificar las diferentes mutaciones en el gen *GLA* se pueden utilizar diferentes técnicas dependiendo de la naturaleza de la mutación (Desnick, et al., 2001, Winchester and Young, 2006). El 90% de las mutaciones (mutaciones puntuales, pequeños reordenamientos) pueden ser detectados amplificando mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) los exones, incluyendo las regiones que lo flanquean, seguido de la detección de los cambios en la secuencia por diferentes métodos. El método más preciso es la secuenciación. La mejor manera de identificar mutaciones (nuevas y conocidas) y las pequeñas inserciones y deleciones es secuenciar toda la zona codificante y las regiones que lo flanquean en ambas direcciones (Eng, et al., 1993). Actualmente es posible secuenciar un número elevado de muestras mediante el método de Sanger automatizado (Aoshima, et al., 2000). Otro método para detectar mutaciones de una forma rápida y sencilla, es el basado en la disociación de temperatura de dos hebras y el análisis de las curvas de fusión (Montgomery, et al., 2010). Este método ha sido utilizado en el cribado mutacional en una población con síntomas de EF (Bono, et al., 2011). Los grandes

reordenamientos, que forman parte del 4-5% del total de las mutaciones, pueden ser detectados mediante la técnica Southern blot utilizando el DNA codificante del gen *GLA* como sonda (Bernstein, et al., 1989) o mediante la PCR multiplex de todo el gen; en cuatro fragmentos (Kornreich and Desnick, 1993). Es difícil detectar deleciones en uno o varios exones especialmente en mujeres heterocigotas. Esas mutaciones pueden ser detectadas mediante la técnica “Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification” (MLPA) (Schirinzi, et al., 2008). Si la mutación no se encuentra en la región codificante del gen o flanqueando a esas regiones y no es un gran reordenamiento, debe ser valorada la posibilidad de que exista una mutación de ajuste (~5% de las mutaciones conocidas) y debe ser caracterizada mediante el análisis del DNA codificante (Ishii, et al., 2002) o mediante la PCR cuantitativa (qPCR) (Filoni, et al., 2008) para analizar la molécula de RNA. Es importante estudiar la expresión del ajuste alternativo de la α -galactosidasa A ya que el transcrito, en condiciones normales, está expresado entre el 1 y el 10% en tejidos. Un desbalance en el ajuste alternativo entre el transcrito fisiológico y el alternativo puede resultar en un déficit enzimático. Se ha sugerido que la qPCR debería estar incluida en el análisis genético de rutina en EF (Ishii, et al., 2002). El RNA de las pacientes sintomáticas que no son portadoras de mutaciones en la región codificante, debería ser analizado (Handa, et al., 2000).

Al igual que otros genes, existen polimorfismos en el gen *GLA* que pueden complicar el diagnóstico en EF alterando la actividad de la α -galactosidasa A. En la región promotora se han descrito varios. Para el polimorfismo g.1150G>A (ISV0-30G>A), los hemocigotos del alelo A ven aumentada tres veces la actividad en el plasma (Fitzmaurice, et al., 1997), en cambio para el polimorfismo g.1170C>T (ISV-10C>T) los portadores del alelo T tienen disminuida la expresión de la enzima (Oliveira, et al., 2008). Este hecho es debido a que estos polimorfismos están situados en regiones reguladoras del gen donde se unen factores de transcripción que aumentan o inhiben la expresión del gen (Oliveira, et al., 2008). Se han encontrado también variantes que afectan la expresión de la enzima en regiones codificantes. La variante D313Y, que tiene un 60% de actividad “*in vitro*” y una actividad baja a pH neutro, tiene una actividad en plasma baja, pero es controvertida la idea de que sea causante de enfermedad (Froissart, et al., 2003, Yasuda, et al., 2003).

1.8.3 Detección de productos de acúmulo

Los productos de acúmulo en EF; en orina y plasma están elevados en muchos de los pacientes pero no en todos. Sin embargo la demostración del incremento de los productos de acúmulo en las muestras biológicas es muy útil para dar un diagnóstico y para monitorizar el tratamiento. Aunque el producto mayoritario de acúmulo es la Gb₃, la liso-Gb₃ se ha visto elevada en plasma de varones y mujeres sintomáticas (Aerts, et al., 2008). Otro producto de acúmulo es la galabiosilceramida (Ga₂ o CDH) menos distribuida que la Gb₃ y los glucoesfingolípidos antigénicos del grupo sanguíneo B y B1. La cantidad de Ga₂ dependerá del estado secretor del paciente y del grupo sanguíneo (Asfaw, et al., 2002, Wherrett and Hakomori, 1973). Las técnicas utilizadas para determinar y cuantificar los glucoesfingolípidos son la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y varias formas de espectrometría de masas (Fauler, et al., 2005, Mills, et al., 2005). Una manera alternativa de determinar Gb₃ en orina es incubar el sedimento urinario con α -galactosidasa A recombinante humana y medir la galactosa liberada mediante un método enzimático (Rozenfeld, et al., 2009). Los datos obtenidos a partir de este método tienen una buena correlación con los obtenidos por HPLC. La correlación más utilizada para normalizar los datos en muestras de orina es la que hay entre la Gb₃ y la creatinina (Whitfield, et al., 2005). La proporción entre la Gb₃ y la creatinina se puede medir simultáneamente en un único análisis pero es importante utilizar controles emparejados por edad y sexo.

1.8.4 Medida de la actividad de α -galactosidasa A en gota de sangre seca

La deficiencia enzimática en EF puede ser demostrada mediante la elución de una gota de sangre seca recogida en papel de filtro, utilizando el protocolo convencional de análisis enzimático con sustrato fluorogénico sintético (Chamoles, et al., 2001). El método de recolección de la gota, afecta a la actividad enzimática y deben estar establecidos los rangos de referencia (Olivova, et al., 2009). Aunque los hemiciotos de fenotipo clásico son detectables de forma fácil, solo dos tercios de los portadores pueden ser detectados mediante este sistema (Linthorst, et al., 2005).

1.9 Otros métodos de diagnóstico.

1.9.1 Histología

La observación de biopsias mediante microscopía óptica no suele ser una gran contribución al diagnóstico, sin embargo la tinción de los lípidos en biopsias de riñón pueden revelar el acúmulo de lípidos dentro del glomérulo (figura 1.18). Cuando la microscopía electrónica no es accesible, las secciones teñidas con azul de toluidina o tricrómico de Mason facilitan el diagnóstico. Debido al elevado número de falsos positivos y al ser un proceso invasivo no suele ser un procedimiento utilizado en el diagnóstico. Los estudios de la ultraestructura mediante microscopía electrónica del endomiocardio y las biopsias de riñón pueden mostrar acúmulo lisosomal en los cardiomiocitos o diferentes tipos celulares renales. La apariencia de las ultraestructuras de las inclusiones se presentan como capas en espiral que alternan material denso y claro (cuerpos de cebra o figuras de mielina) (figura 1.18).



Figura 1.18: Imagen de microscopía electrónica de una biopsia de riñón. Imagen adaptada de: (Germain, 2010).

La biopsia de piel observada por microscopia electrónica puede utilizarse como apoyo al diagnóstico pero es de difícil interpretación (Navarro, et al., 2006). Además las biopsias en mujeres heterocigotas suelen ser normales y no son de gran utilidad.

1.10 Biomarcadores en la EF

Un biomarcador o marcador biológico es una molécula utilizada como indicador de un proceso biológico. Debe poder medirse de una forma objetiva y sencilla y reflejar un estado fisiológico, patológico o la respuesta al tratamiento. Uno de los objetivos más importantes en investigación en EF es encontrar biomarcadores validados y fidedignos que nos permitan evaluar la progresión de la enfermedad y la respuesta al tratamiento. Idealmente estos marcadores subrogados a la enfermedad deberían obtenerse de una forma no invasiva. Actualmente no existen buenos marcadores en plasma o urinarios y aunque varias técnicas de imagen, han aportado resultados prometedores, la relevancia clínica de lo que revelan aún no ha sido evaluada para su correlación con los síntomas clínicos. Se han encontrado niveles medianamente altos de quitotriosidasa en pacientes hemicigotos pero no en mujeres heterocigotas (Vedder, et al., 2006). Es bien conocido el incremento en plasma y orina de Gb₃ en pacientes hemicigotos sintomáticos. En mujeres heterocigotas los niveles plasmáticos tienden a estar dentro de la normalidad mientras que en orina se pueden encontrar elevados. (Mills, et al., 2004). La liso-Gb₃ se ha encontrado elevada en el plasma de varones hemicigotos y en menor medida en mujeres con fenotipo clásico de la enfermedad. Puede ser un biomarcador interesante para el seguimiento de la TES (Aerts, et al., 2008) mientras que en mujeres la concentración de liso-Gb₃ plasmática correlaciona con la gravedad global de la enfermedad (Rombach, et al., 2010). La liso-Gb₃ puede tener un papel en el daño glomerular promoviendo la liberación de citoquinas proinflamatorias como mediadores secundarios del daño glomerular como el TGF- β 1 y el receptor del factor inhibitorio de macrófagos CD74 común en nefropatía diabética (Sanchez-Niño, et al., 2011). Así como en otras enfermedades lisosomales en las que está asociado un componente proinflamatorio, las citoquinas podrían actuar como biomarcador potencial en la EF (Barak, et al., 1999). La accesibilidad de los biomarcadores en EF (en comparación con otras enfermedades lisosomales, como la EG, en que la cantidad y calidad de los biomarcadores es

mayor) es de imperiosa necesidad para detectar las manifestaciones tempranas de la enfermedad y poder evitar el inicio de intervenciones terapéuticas invasivas y costosas y en definitiva, mejorar la calidad de vida de los pacientes.

1.11 Tratamiento

En los últimos años se han llevado a cabo muchos avances en el tratamiento de las enfermedades lisosomales. Antes del año 1990, no existía un tratamiento específico para estas enfermedades y únicamente se podían ofrecer tratamientos paliativos para las morbilidades asociadas a la enfermedad. La situación cambió radicalmente desde que apareció la primera enzima sustitutiva obtenida de placentas humanas para el tratamiento de la enfermedad de Gaucher (Brady, et al., 1974), que fue la primera en disponer de un tratamiento eficaz para combatir los síntomas de la enfermedad. Posteriormente y por tecnología recombinante se han obtenido otras enzimas sustitutivas aplicables a otras enfermedades lisosomales. Primeramente en Estados Unidos y más tarde en Europa, la regulación para los fármacos huérfanos, es decir aquellos que son aplicables a enfermedades raras, ha sido un acicate para la industria farmacéutica para desarrollar fármacos para estas enfermedades minoritarias, proporcionándoles beneficios, como darles la exclusividad en el mercado por un periodo de 10 años. Actualmente, nuevas aproximaciones terapéuticas han sido desarrolladas como la inhibición de sustrato y las chaperonas farmacológicas que se encuentran actualmente en investigación en ensayos clínicos.

1.11.1 Terapia enzimática sustitutiva

En el año 2001 se introdujo por primera vez el uso de la enzima recombinante humana α -galactosidasa A como TES. En Europa, actualmente, se comercializan dos enzimas recombinantes (Lee, et al., 2003, Sakuraba, et al., 2006): la algasidasa alfa (Replagal®; Shire; Cambridge, MA, USA), producida a partir de líneas celulares de fibroblastos humanos de la piel (dosis: 0,2 mg/kg cada dos semanas) y la algasidasa beta (Fabrazyme®; Genzyme-Sanofy, Cambridge, MA, USA) producida a partir del cDNA de la α -galactosidasa A en líneas celulares de ovario de hámster chino (dosis: 1 mg/kg cada dos semanas). Aunque los dos productos tienen la misma secuencia de aminoácidos, las dos enzimas recombinantes difieren en la cantidad de residuos de manosa-6-fosfato y en la proporción de ácido siálico en relación a la galactosa. Esto

INTRODUCCIÓN

influye en la interacción de la proteína con los receptores de asialoglicoproteínas, mayoritariamente localizados en los hepatocitos y los receptores de manosa-6-fosfato distribuidos por varios tejidos afectando a la biodisponibilidad (Lee, et al., 2003).

A diferencia de otras enfermedades lisosomales como la EG en la que el acúmulo de material en el lisosoma está mayoritariamente restringido a la línea celular monocito-macrófago, en la EF están comprometidos un número mayor de tejidos. Por ese motivo la accesibilidad de la enzima es menor que en la EG. Aunque el proceso patológico en el tejido endotelial juega un papel muy importante, no puede explicar por completo el cuadro clínico en la EF, únicamente con el acúmulo de Gb₃ en este tejido. Se han realizado varios estudios clínicos comparando los parámetros bioquímicos pre- y post-tratamiento en muestras de plasma y tejidos. La TES aporta beneficios sobre órganos como el corazón, riñón y otros tejidos como el endotelial aunque no resulta tan eficaz como la enzima sustitutiva para la EG (Beck, 2010). La variedad y gravedad de los síntomas en la EF es muy grande y no existen buenos biomarcadores para su seguimiento. Esto dificulta mucho la elaboración de protocolos para la administración del fármaco. La TES tiene varias limitaciones: la primera es que la enzima recombinante, como ocurre en otras enfermedades de depósito, no puede atravesar la barrera hematoencefálica, con lo cual no llega a ser distribuida al sistema nervioso central. Pueden producirse reacciones de hipersensibilidad a la administración de la enzima intravenosa. Los anticuerpos generados a la larga pueden decrecer la eficacia de la terapia bloqueando la enzima (Wang, et al., 2008). La terapia no tiene eficacia sobre órganos que han sido afectados de forma irreversible como la afectación renal en estadio III (Schiffmann, et al., 2006). Muchas de las limitaciones de la TES posiblemente estén relacionadas con el momento en el que se empieza a administrar el fármaco, por eso un diagnóstico temprano es importante para el éxito terapéutico. Con objeto de iniciar el tratamiento lo antes posible fueron desarrollados programas de cribado en neonatos (Spada, et al., 2006, Zhang, et al., 2008).

1.11.2 Terapia de reducción de sustrato

La inhibición de la síntesis de sustrato es una alternativa terapéutica prometedora para las enfermedades de acúmulo lisosomal. Esta aproximación terapéutica en la EF lleva a la reducción de la síntesis de Gb₃ a través del descenso de la deposición de ceramida. La glucosilceramida sintasa es una de las dianas potenciales para esta aproximación terapéutica. Su inhibición conduce a una reducción en la síntesis de la glucosilceramida, precursor de glucoesfingolípidos neutros y gangliósidos. La *N*-butildeoxinojirimicina (OGT 918 o miglustat, Zavesca[®]) ha sido probada con éxito en el tratamiento de la EG (Cox, et al., 2000), sin embargo el fármaco produce efectos secundarios reversibles como la diarrea y temblor (Abe, et al., 2001). En la EF se han realizado diferentes aproximaciones para aplicar la terapia de reducción de sustrato pero ninguno ha llegado a aplicarse en humanos (Abe, et al., 2000)

1.11.3 Tratamiento con chaperonas

En la EF un gran número de mutaciones son mutaciones puntuales que generan una proteína inestable aunque catalíticamente funcional (Garman, 2007, Garman and Garboczi, 2004). La forma purificada de esta enzima es catalíticamente comparable a la proteína no mutada (Ishii, et al., 2007) pero las enzimas mutadas no son capaces de llegar al lisosoma debido a un problema en el plegamiento de las formas intermedias que altera el tráfico intracelular. Los estudios del tráfico intracelular y degradación de las enzimas mutadas indican que estas quedan retenidas en el retículo endoplasmático (RE) y son degradadas por el mecanismo programado asociado al RE (ERAD) debido a las conformaciones intermedias mal plegadas (Ishii, et al., 2007). Este es el fundamento para el uso de pequeñas moléculas: las chaperonas que estabilizan las conformaciones intermedias de la proteína y así reducir la degradación prematura mediante ERAD (Fan and Ishii, 2007, Yam, et al., 2006, Yam, et al., 2005). Los inhibidores enzimáticos que provienen de la familia de los imino azúcares pueden actuar también como chaperonas farmacológicas activas, incrementando la actividad residual enzimática y estabilizándola (Fan, et al., 1999, Okumiya, et al., 1995).

Los iminoazúcares mimetizan a los monosacáridos, cambian un átomo de nitrógeno en lugar del átomo de oxígeno presente en los monosacáridos y pueden actuar como

INTRODUCCIÓN

potentes inhibidores de las glucosidasas. Debido a que los iminoazúcares tienen una alta afinidad por el centro activo de la enzima diana, estos pueden actuar como chaperona específica de sitio activo estabilizando las formas de plegamiento intermedias (figura 1.19) (Sugawara, et al., 2009). La 1-Deoxigalactonojirimicina (DGJ), administrada de forma oral; actualmente en investigación clínica con el nombre de Amigal™ (Migalastat hidrocloreuro; Amicus therapeutics, Cranbury, NJ, USA) es un pequeño iminoazúcar que simula a la α -galactosa de la Gb₃. La fuerte unión de la DGJ con la enzima mutante mejora el plegamiento y la estabilidad de la enzima y le facilita el tráfico hacia el lisosoma (Germain and Fan, 2009). La DGJ solo resulta efectiva en pacientes con mutaciones que responden a la interacción con la chaperona.

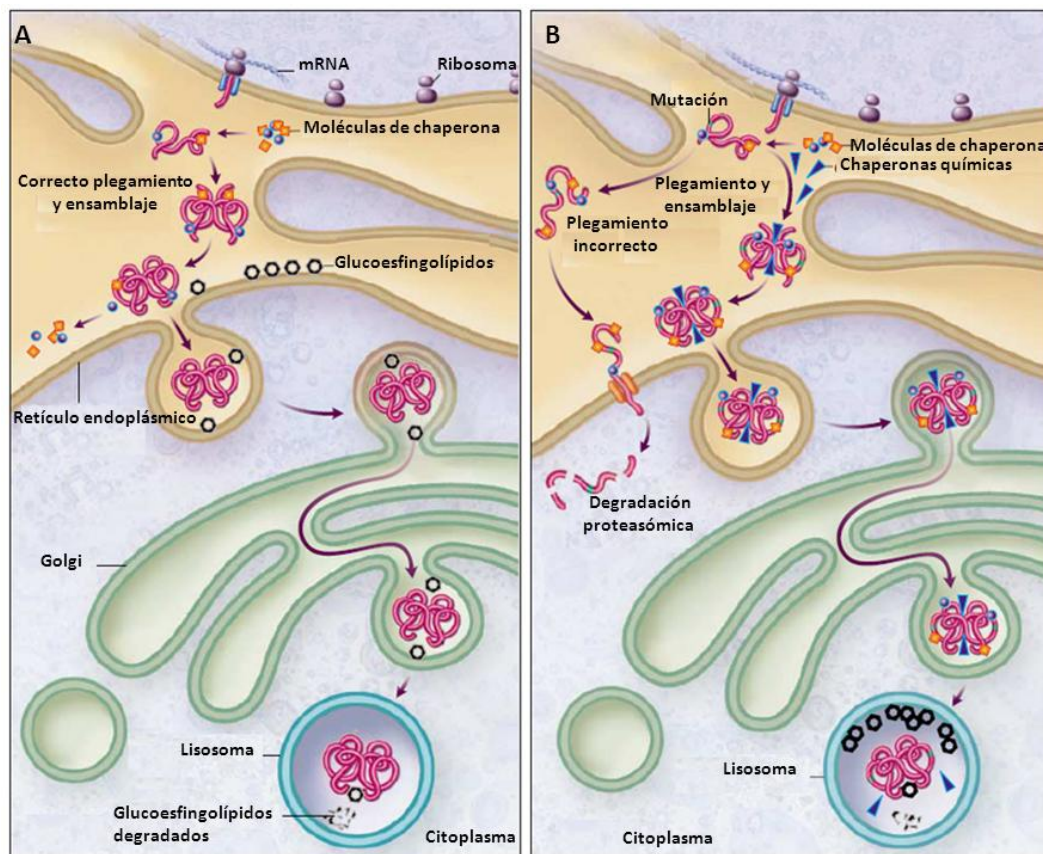


Figura 1.19: Mecanismo propuesto para las chaperonas específicas del centro activo. A) Mecanismo para la enzima no mutada, B) mecanismo para la enzima mutada. Imagen adaptada de la fuente: <http://www.lysosomalstoragerearch.ca/>.

OBJETIVOS

2. Objetivos

La EF es una alteración de acúmulo lisosomal producida por una deficiencia de la enzima lisosomal α -galactosidasa A. Este defecto conlleva a la acumulación de glucoesfingolípidos, Gb₃ de forma mayoritaria, en los lisosomas de varios tejidos; principalmente en el epitelio vascular, renal, cardíaco y el sistema nervioso (Desnick, et al., 2001). De acuerdo con el tipo de mutación en el gen *GLA*, gen que codifica para la síntesis de la α -galactosidasa A, y el inicio de las manifestaciones clínicas, los casos de EF se clasifican en dos tipos de fenotipos, el tardío y el clásico. Las manifestaciones clínicas del fenotipo clásico en los varones, incluyen las acroparestesias; angioqueratomas; hipohidrosis; opacidad corneal y lenticular; disfunción cardíaca; alteraciones renales y del sistema nervioso central (Mehta, et al., 2004). Las mujeres portadoras pueden ser asintomáticas o llegar a desarrollar el fenotipo clásico (Desnick, et al., 2001) debido al fenómeno de inactivación del cromosoma X (Lyon, 1961). El diagnóstico en la EF, probablemente, está subestimado debido a la naturaleza no específica de las manifestaciones clínicas asociadas a la enfermedad. El tratamiento en las primeras fases de desarrollo de la enfermedad es muy importante para la mejora de calidad de vida del paciente e impedir secuelas irreversibles (Desnick, et al., 2003, Eng, et al., 2006).

Hasta la fecha se han descrito más de 600 mutaciones causales de EF (Stenson, et al., 2003) (ver enlaces), además el gen *GLA* (ENSG00000102393) presenta siete variantes fisiológicas de ajuste alternativo (Ensembl, ver enlaces) y la alteración del patrón de ajuste, se genera por una gran cantidad de esas mutaciones. Las mutaciones exónicas pueden también alterar el patrón de ajuste, pero no son reconocidas fácilmente (Lai, et al., 2003). Han sido descritas un gran número de variantes polimórficas del gen *GLA* pero no se ha demostrado si la herencia de haplotipos formados por la combinación de estas variantes puede causar EF. El haplotipo complejo intrónico (HCI) dentro del gen *GLA* (IVS0-10C>T, IVS2-76_80del5, IVS4-16A>G, IVS6-22C>T) ha sido asociado a neuropatía de fibra fina (Tanislav, et al., 2011), y en un estudio de cribado el 8,9% de sujetos con síntomas de EF presenta este haplotipo (Bono, et al., 2011). El haplotipo IVS2-76_80del5, IVS4-16A>G, IVS6-22C>T ha sido detectado en pacientes con afectación renal

OBJETIVOS

(Bekri, et al., 2005, Valbuena, et al., 2008). Por otra parte la mutación G183V (c.548G>T) también ha sido asociada a la EF; esta mutación se encuentra en la junta del exón 3 con el 4 en la región codificante del gen *GLA*, causando el cambio de aminoácido 183 en la secuencia proteica de la enzima y posiblemente un patrón aberrante de ajuste (Lai, et al., 2003).

La identificación de los pacientes de Fabry en la población general está dificultada por la baja prevalencia de la enfermedad y la naturaleza heterogénea de sus síntomas. El diagnóstico viene determinado por niveles bajos de actividad enzimática y confirmado por el estudio mutacional. El problema es que la enfermedad carece de biomarcadores que reflejen el estado del paciente. El análisis enzimático no es adecuado para el diagnóstico y seguimiento de mujeres heterocigotas, ya que la expresión de la enzima depende del patrón de activación del cromosoma X, o para varones con variantes atípicas de la enfermedad en los que la actividad residual es muy alta. No existe una relación entre el genotipo y el fenotipo que presentan los pacientes.

La terapia principal de la enfermedad se basa en la administración de la enzima recombinante humana por vía intravenosa. Aunque la respuesta de la terapia en muchos casos es buena no refleja una mejora en todas las morbilidades asociadas a la EF. Existen indicios de que hay otros mecanismos implicados en el desarrollo de la enfermedad y el conocimiento molecular de esos mecanismos, puede permitir identificar nuevas dianas terapéuticas para la mejora de la calidad de vida de los pacientes con EF.

Teniendo en cuenta estos hechos nos planteamos los siguientes objetivos:

- 1.-Caracterizar funcionalmente las variantes del haplotipo complejo intrónico (IVSO-10C>T, IVS2-76_80del5, IVS4-16A>G, IVS6-22C>T) y G183V encontradas en un grupo de individuos con y sin síntomas y signos de EF y profundizar en los mecanismos moleculares patológicos relacionados con las diferentes manifestaciones clínicas de la enfermedad.
- 2.-Identificar los mecanismos epigenéticos relacionados con las diferentes variantes clínicas de la EF.
- 3.-Buscar nuevos biomarcadores de diagnóstico y seguimiento de la enfermedad.

4.-Realizar una prueba de concepto de aplicación de fármacos hipometilantes en líneas primarias de fibroblastos en la EF.

MATERIALES Y MÉTODOS

3. Materiales y Métodos

3.1 Pacientes y controles

Hemos analizado 25 sujetos pertenecientes a dos familias diagnosticadas en la Unidad de Enfermedades Lisosomales del Hospital Universitario Miguel Servet de Zaragoza.

La familia 1, portadora de un haplotipo complejo intrónico (HCI), estaba compuesta por un total de 15 individuos de los cuales, 6 eran heterocigotos y 4 hemicigotos, en un rango de edad comprendido entre 7 y 72 años. La familia 2, portadora de una mutación puntual, ubicada en la junta del exón 3 y 4, estaba compuesta por 10 individuos de los cuales, 6 eran heterocigotos y 2 hemicigotos en un rango de edad comprendido entre 45 y 78 años. Como controles se utilizaron un varón de 30 años y una mujer de 56 años.

Tanto los controles como los pacientes, o sus tutores, 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 firmaron el consentimiento informado y por escrito de todos los participantes en el estudio, autorizando el uso en investigación de las muestras biológicas que les fueron extraídas. Este estudio fue aprobado por el Comité de ética de Investigación Clínica de Aragón (CEICA), del Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud (Zaragoza, España) y 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.

3.2 Extracción de muestras de sangre periférica

Se realizó la extracción de sangre periférica mediante flebotomía de la vena cubital para la posterior obtención de muestra de DNA, RNA, plasma y suero de cada sujeto. Para ello se extrajeron 20 ml de sangre periférica en viales Vacutainer® (Becton Dickinson) de 10 ml, provistos de sal dipotásica del ácido etilendiaminotetraacético (K₂ EDTA) a una concentración de 1mg/dl como anticoagulante. 5 ml de sangre periférica en viales PAXGENE blood RNA system (PreAnalytix) de 2,5 ml, que permiten la estabilización del RNA total y 6 ml en un vial con gel separador Vacutainer® (Becton Dickinson)

Todas las muestras fueron codificadas, de modo que todos los estudios posteriores se realizaron de manera anónima.

El plasma se separó de las células sanguíneas mediante centrifugación a $3.500\times$ r.p.m y 4°C durante 10 minutos en una centrífuga 5810 R (Eppendorf). Las células sanguíneas se resuspendieron en una disolución salina, NaCl 0,9% (p/v), hasta alcanzar el volumen inicial, evitando de esta forma la modificación de la concentración inicial de los elementos formes. Se congelaron a -20°C para aislar posteriormente el DNA, o bien se procesaron inmediatamente.

El suero se separó de las células sanguíneas mediante centrifugación a $3.500\times$ r.p.m y 4°C durante 10 minutos en una centrífuga 5810 R (Eppendorf).

El plasma y el suero se alicuotó y se congeló a -80°C .

Los viales para la extracción del RNA se congelaron a -20°C y al día siguiente se almacenaron a -80°C hasta su posterior uso.

3.3 Obtención de un concentrado de leucocitos a partir de sangre periférica

El concentrado de leucocitos se obtuvo a partir de 14 ml de sangre periférica extraída en viales con EDTA, (como anticoagulante) no congelada previamente. Para ello se mezcló en una jeringa de 20 ml la sangre con 4 ml de dextrano (Sigma-Aldrich) al 6% (P/V) en suero salino por inversión y se dejaron formar las fases durante una hora y media por gravedad. Una vez formadas las fases, se recoge la fase superior en un vial de 15 ml evitando la fase inferior que contiene la mayoría de células de la serie roja. Se centrifugó el sobrenadante a una velocidad de $2.000\times$ r.p.m durante 10 minutos. Se decantó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 1 ml de disolución de NaCl al 0,9% (P/V). Se añadieron 5 ml de NH_4Cl al 0,83% (P/V) y se dejó incubar la muestra a temperatura ambiente durante 5 minutos. Se centrifugó a $2.000\times$ r.p.m durante 10 minutos. Se decantó el sobrenadante y el precipitado se lavó dos veces con 5 ml de disolución de NaCl al 0,9% (P/V) centrifugando a $2.000\times$ r.p.m durante 10 minutos. El precipitado ya limpio se resuspendió en 3ml de NaCl al 0,9% (P/V) y se dividió el volumen en 2 viales de 1,5 ml. Para finalizar se centrifugaron los viales en una micro centrífuga a $10.000\times$ r.p.m durante 30 segundos, se

decantaron los sobrenadantes y los precipitados se congelaron a -80°C hasta su posterior uso.

3.4 Biopsias de piel

Para la obtención de fibroblastos se realizaron biopsias de piel, para lo cual se limpió la zona con una mezcla de clorexhidina/etanol al 70% y se aplicó anestesia local subcutánea, Mepivacaina hidrocloreuro 20mg/ml (Inibsa). Una vez el área estuvo anestesiada, se procedió al troquelado de 3mm de piel (Biopsy punch 3mm, Stiefel), su obtención con pinzas estériles y posterior corte con bisturí. La biopsia se recogió en un vial de 15ml con medio de cultivo estéril Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) con glutamax \times 1 (Gibco), 20% Suero fetal bobino (SFB) (Gibco), 1% penicilina-estreptomicina (Gibco) y 0,5% β -amfotericina (Gibco) a temperatura ambiente. El lugar de la biopsia fue tratado con Mupirocina 20mg/g (Stiefel Farma) y cubierto con un apósito.

3.5 Biopsia de riñón. Procedimiento y procesado

La biopsia de riñón fue obtenida por el Servicio de Urología y procesada por el Departamento de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Miguel Servet de Zaragoza. Las muestras de tejido fueron obtenidas mediante una biopsia de riñón percutánea con localización ecográfica de acuerdo con los procedimientos clínicos habituales (Whittier and Korbet, 2004, Wiseman, et al., 1990). Fueron tomadas siete muestras del núcleo y procesadas apropiadamente para microscopia óptica y electrónica, de acuerdo con los protocolos de histopatología clásica (Furness, 2000, Walker, et al., 2004). Los fragmentos seleccionados conteniendo más de 6 glomérulos fueron procesados para microscopia óptica y fijados en formalina tamponada al 10%, embebida en un bloque de parafina y teñida con hematoxilina-eosina, ácido periódico de Schiff y tricrómico modificado. Los fragmentos seleccionados para microscopia electrónica fueron fijados en una solución de glutaraldehído al 3%, post fijados en tetraóxido de osmio y embebidos en resina epoxi.

3.6 Obtención de DNA genómico

3.6.1 De muestras de sangre periférica

El DNA genómico se obtuvo mediante el equipo de reactivos Nucleon Bacc 3 Genomic DNA extraction Kit (GE Healthcare) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, se añadieron 7,5 ml de sangre periférica en un vial de 50ml y 5,5 volúmenes del reactivo A. El reactivo A se abrió a la llama para poder trabajar en condiciones de esterilidad. Se agitó la mezcla durante 10 minutos y centrifugó durante 15. Después se eliminó el líquido sobrenadante, decantándolo con sumo cuidado de no perder el precipitado. Se añadieron 2 ml del reactivo B para producir la lisis celular y se traspasó el contenido a otro vial. Se añadieron 500 µl de perclorato sódico y el vial se agitó por inversión 7 veces. Posteriormente se añadieron 2ml de cloroformo y se agitó de nuevo por inversión 7 veces. Se dejó reposar el vial hasta la formación de 2 fases lo más claras y visibles. Una vez formadas las dos fases se añadieron 300 µl de resina Nucleon y se centrifugó. La fase superior formada tras el paso de centrifugado se trasvasó a un vial de polipropileno de 15ml con sumo cuidado de no arrastrar la interfase y se añadió el mismo volumen de etanol absoluto frío sobre la fase superior formada. Se agitó con cuidado de forma que precipitasen las hebras de DNA. Mediante el uso de una pipeta “Pasteur” de vidrio, por adhesión, se aisló el DNA y se introdujo durante 5 segundos en etanol al 70% (V/V) para eliminar las sales. Seguidamente el DNA se rehidrató en tampón TE 1× (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0) y se dejó en un agitador orbital durante 24 horas para su hidratación.

3.6.2 A partir de fibroblastos de cultivo primario

El DNA genómico a partir de fibroblastos de cultivo primario se obtuvo mediante el equipo de reactivos High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche) siguiendo las instrucciones del fabricante a partir de células cultivadas en una placa tipo T6 (TPP) con pequeñas variantes sobre el protocolo original. Para ello, el precipitado aislado, se resuspendió en 200 µl de PBS 1× y se añadieron 200 µl de tampón de unión y 40 µl de proteinasa K. Cada muestra se incubó a una temperatura de 70° durante 10 minutos y posteriormente se añadieron 100 µl de isopropanol. La mezcla se cargó a las columnas y se centrifugó. Se añadieron 500 µl de inhibidor del tampón de

eliminación y se centrifugó. Seguidamente se realizaron dos pasos de lavado añadiendo a la columna 500 μ l de tampón de lavado centrifugando y un último paso de centrifugado a máxima velocidad durante 10 segundos. La columna se puso sobre un vial de 1,5 ml y se añadieron sobre la columna 100 μ l de tampón de elución precalentado a 70°C. Se centrifugó la muestra y el DNA obtenido se cuantificó mediante los métodos descritos en el apartado 3.6.3. El DNA fue almacenado a -80°C hasta su posterior aplicación.

3.6.3 Análisis de concentración y pureza

Una vez que la muestra de DNA estaba completamente hidratada se procedió a analizar su concentración y su pureza mediante espectrofotometría. Los ácidos nucleicos, absorben radiación en la zona del espectro del ultravioleta debido a la presencia de bases nitrogenadas aromáticas en su estructura, a una longitud de onda (λ) de 260 nm. Las proteínas, debido a la presencia de aminoácidos aromáticos en su estructura, absorben la radiación a una λ de 280 nm. De esa manera se determinó la concentración de DNA a partir de las absorbancias tomadas por el espectrofotómetro Nanodrop 2000C (Thermo) a 260 nm. La medida de pureza se llevó a cabo mediante el cociente 260/280 nm. Se consideró que la pureza era adecuada cuando el rango de la tasa de variación 260/280 nm estuvo comprendido entre 1.8-2.

3.7 Obtención de RNA total

3.7.1 De muestras de sangre periférica.

El RNA total al partir de sangre periférica se aisló utilizando el equipo de reactivos PAXgene Blood RNA (PreAnalytix) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Antes de empezar con el protocolo se dejaron los viales PAXgene con sangre periférica congelada a temperatura ambiente durante toda la noche. Una vez descongelados los viales, se agitaron por inversión 11 veces y se centrifugaron a una velocidad de 4.000 \times g durante 11 minutos. Todos los pasos de centrifugado fueron llevados a cabo a temperatura ambiente. Se decantó totalmente el líquido sobrenadante con cuidado de no levantar el precipitado y sin voltear el vial a la posición inicial, se limpió el borde del vial con papel secante. Se cerró con un tapón “Hemogard” nuevo y se agitó mediante el agitador automático de tal manera que el

precipitado fuera disgregado totalmente y evitando que quedaran fragmentos en la pared del vial. A partir de ahí se continuó con el protocolo del fabricante. Finalmente para eluir el RNA se descartó el vial colector, se introdujo la columna en un vial de 1,5 ml y se añadieron 40 μ l de tampón de elución directamente sobre la membrana de la columna. Se incubaron las muestras durante 2 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó un minuto a una velocidad de 11.000×r.p.m. Después se añadieron otros 40 μ l de tampón de elución directamente sobre la membrana de la columna y se repitió el paso anterior. Al final se unificaron las muestras de RNA de cada paciente; se procedió directamente a la cuantificación y si era necesario a la purificación.

3.7.2 A partir de fibroblastos de cultivo primario

El RNA total al partir de fibroblastos de cultivo primario se aisló utilizando el equipo de reactivos Vantage Total RNA Purification Kit (Origene) siguiendo las recomendaciones del fabricante, a partir de células, cultivadas en una placa del tipo T6 (TPP). Brevemente; se añadió la solución de lisis directamente sobre el precipitado de células aislado de cada pocillo congelado. Después de agitarlo mediante el agitador mecánico se añadieron 200 μ l de etanol absoluto. Se centrifugaron las muestras para eliminar los posibles fragmentos celulares y se pasaron por las columnas. Se realizaron tres pasos de lavado y la muestra de RNA se eluyó distribuido en dos tandas de 25 μ l de tampón de elución recogido sobre el mismo vial. Se procedió a la cuantificación y si era necesario a la purificación

3.8 Cuantificación; determinación de la pureza y purificación

3.8.1 Cuantificación del RNA por espectrofotometría

Una vez obtenida la muestra de RNA total se procedió a analizar su concentración y pureza mediante espectrofotometría, a partir de las absorbancias tomadas por el espectrofotómetro Nanodrop 2000C (Thermo) a una λ de 260 nm. La medida de pureza se llevó a cabo mediante el cociente 260/280 nm. Los valores de pureza óptimos fueron los que estuvieron comprendidos en el rango 1,8-2,2. Adicionalmente se valoró la relación 260/230 nm considerándose aceptables valores superiores a 1,8.

Si no se cumplían los valores de mínimos de pureza se procedía a la purificación.

3.8.2 Purificación del RNA total

Para purificar el RNA total se añadieron 0,1 volúmenes de acetato de sodio NaAc, 3M a pH=5,2 (Sigma-Aldrich) y 2,5 volúmenes de etanol absoluto (JT Baker) frío sobre la muestra de RNA. Tras mezclar con el agitador automático durante 5 segundos aproximadamente, se incubó a -20°C durante una hora. Transcurrido ese tiempo se centrifugó la muestra a una velocidad de 13.500×r.p.m durante 20 minutos y se eliminó el sobrenadante por decantación. Se añadieron 500 µl de etanol al 70% (V/V) frío y se agitó por inversión varias veces. Se centrifugó la muestra a una velocidad de 13.500×r.p.m durante 20 minutos y se eliminó el sobrenadante cuidadosamente mediante una micropipeta. Se repitió el paso anterior y se dejó secar el precipitado de RNA durante 5-10 minutos aproximadamente, hasta que las “microgotas” de alcohol desaparecieron, sin dejar secar totalmente el precipitado para favorecer su resuspensión. Se resuspendió en un volumen de 35 µl de agua libre de RNAsas comprobando que quedase completamente disuelto. Se dejó la solución de RNA total en hielo y se procedió a cuantificar y determinar su pureza.

3.8.3 Determinación de la integridad del RNA

Finalmente para determinar la integridad del RNA se analizaron 500 ng de RNA total y un 1µg de marcador de DNA de bajo peso molecular (Invitrogen) en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio, 0,5 µg/ml (Sigma-Aldrich) en tampón TAE 1× (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM pH 8,0) por electroforesis a 94 V durante 30 minutos. Tras visualizar el gel en el transiluminador (Bio-Rad), se verificó que el RNA total cumplía con los parámetros de calidad.

3.9 Análisis molecular del gen *GLA*

Para realizar el análisis mutacional del gen *GLA*, se diseñaron amplificaciones mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), para el promotor y los 7 exones, partiendo de las regiones intrónicas adyacentes. El diseño de las amplificaciones por PCR se llevó a cabo a partir de la secuencia del gen obtenida en la base de datos Ensembl (ver enlaces). La referencia de la secuencia génica que se utilizó es (ENSG00000102393). Mediante el programa informático Oligo v.6.0 (MBI) se diseñaron los cebadores para amplificar los fragmentos de interés (tabla 3.1).

Tabla 3.1: Cebadores para la amplificación del gen *GLA*.

CEBADOR		PRODUCTO		
NOMBRE	SECUENCIA	pb	Th	TAMAÑO
D-promGLA	5'-CCA CAC ACC AAC CTC TAA CGA TAC-3'	24	54	422
R-promGLA	5'-GGT GAC CGG ACA GCA TAA AT-3'	20		
D-exon1GLA	5'-TAG GGC GGG TCA ATA TCA AG-3'	20	54	491
R-exon1GLA	5'-TCC CGT TGA GAC TCT CCA GT-3'	20		
D-exon2GLA	5'-GTG AAA TCC CAA GGT GCC TA-3'	20	54	345
R-exon2GLA	5'-GCC ATG AGG GCT GTT TCT AA-3'	21		
D-exon3GLA	5'-GCT ACC TCA CGA TTG TGC TTC TAC-3'	24	54	295
R-exon3GLA	5'-TCA GCT ACC ATG GCC TCA AAG TTC-3'	24		
D-exon4GLA	5'-TTC ATT TCT TTC CCT TAT TTT ACC C-3'	25	54	232
R-exon4GLA	5'-GTA AGT AAC GTT GGA CTT TGA AGG A-3'	25		
D-exon5GLA	5'-CCT CCT TTA AAC TGT TTT CAT CTC A-3'	25	54	304
R-exon5GLA	5'-ACC TTG AAT GTC AAA ATA GGA AAC A-3'	25		
D-ISV6GLA	5'- AGC CAA AGC TCT CCT TCA GGA TAA G-3'	25	54	349
R-ISV6GLA	5'- GGG AAG CAA CTG CGA TGG TAT AAG A-3'	25		
D-exon7GLA	5'-CCA AAC TAA CAG GGC CAC TT-3'	20	54	434
R-exon7GLA	5'-ATG AGC CAC CTA GCC TTG AG-3'	20		
D-exon3'GLA	5'-CCC CAA TAC CTG GTG AAG TAA-3'	21	54	407
R-exon3'GLA	5'-TTT CCA GTA TTG TGA CAG GGT ATT T-3'	25		

Para realizar las amplificaciones, en un vial de 0,2 µl se añadieron la enzima EcoTaq DNA polimerasa (Ecogen), el tampón y el MgCl₂ correspondientes, los nucleótidos (dNTPs) (Invitrogen), los cebadores (Invitrogen), el DNA y el agua destilada estéril hasta alcanzar un volumen final de 20 µl. Las cantidades y concentraciones finales se muestran en la tabla 3.2.

Tabla 3.2: Cantidades y concentraciones finales para las amplificaciones por PCR del gen *GLA*.

REACTIVO	CANTIDAD (µl)	CONCENTRACIÓN FINAL
dH ₂ O estéril	13,45	
Tampón (10X)	2	1x
dNTPs (2mM)	2	200 µM
MgCl ₂ (50mM)	0,6	1,5 mM
Cebador directo (10µM)	0,4	200 µM
Cebador reverso (10µM)	0,4	200 µM
EcoTaq DNA polimerasa 5U/µl	0,15	0,75 U
DNA (100ng/µl)	1	100 ng/µl

La reacción de PCR se llevó a cabo en un termociclador GeneAmp[®] 9700 (Applied Biosystems). Los programas térmicos para cada amplificación fueron idénticos. Las condiciones térmicas para la amplificación del gen *GLA* fueron: 94°C durante 5 minutos, 45 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 54°C, 30 segundos a 72°C, una extensión final de 7 minutos a 72°C y finalmente 4°C ∞. El producto de las amplificaciones se conservó a 4°C para su posterior uso y finalmente el almacenado se llevó a cabo a una temperatura de -20°C. El resultado de las diferentes amplificaciones se comprobó por electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio en TAE 1× aplicando un voltaje de 94 V durante 30 minutos.

3.9.1 Purificación de los productos de PCR mediante ExoSAP-IT[®] (USB)

El reactivo ExoSAP-IT[®] (USB) consta de dos enzimas. La exonucleasa I, que degrada el DNA monocatenario (cebadores y extremos incompletos) residual de la reacción de PCR y la fosfatasa alcalina (SAP) que hidroliza los nucleótidos que no han sido insertados en los amplicones.

Para la purificación de los productos de PCR, en un vial de 0,2 ml se introdujeron 2 µl de producto de PCR y 7 µl del reactivo ExoSAP-IT[®] (USB). La muestra se incubó en un termociclador GeneAmp[®] 9700 (Applied Biosystems) a 37°C durante 40 minutos y a 80°C durante 15 minutos para la inactivación de las enzimas. Los productos purificados se almacenaron a 4°C para su inmediato uso.

3.9.2 Análisis de la secuencia de los amplicones mediante secuenciación.

Se partió de los amplicones de cada región del gen purificados mediante el procedimiento del apartado 3.9.1. Se realizaron dos reacciones de secuenciación. Una para la hebra de DNA directa y otra para la hebra reversa a partir de los mismos cebadores diseñados para la reacción de PCR descritos en la tabla 3.1. Para llevar a cabo la reacción, se partió del equipo de reactivos DYEnamic[™] ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (GE Healthcare). Este equipo de reactivos contiene una mezcla denominada “DYEnamic ET terminator reagent premix” que está compuesta por una DNA polimerasa termoestable (Thermo Sequenase[™]), nucleótidos y didesoxinucleótidos trifosfato terminadores (ddNTPs), marcados con fluoresceína, que actúan como donadores y fluoróforos derivados de la rodamina, uno diferente para cada ddNTP, que actúan como aceptores y permiten la detección automática posterior.

Las reacciones se prepararon en un volumen final de 10 µl en las proporciones que se indican en la tabla 3.3.

Tabla 3.3: Cantidades de los reactivos empleados en la reacción de secuenciación.

REACTIVO	CANTIDADES
Producto de PCR purificado	2 μ l
Premix: DYEnamic ET Terminator reagent	3 μ l
Cebador de secuenciación (5 μ M)	1 μ l
dH ₂ O	4 μ l

Las condiciones térmicas para la reacción de secuenciación fueron: 35 ciclos de 20 segundos a 94°C, 15 segundos a 50°C, 1 minuto a 60°C y finalmente 4°C ∞ . Los productos de la reacción de secuenciación se purificaron por precipitación alcohólica. Para ello se añadió 1 μ l de NH₄Ac, 7,5 M y 28,5 μ l de etanol absoluto frío y se centrifugaron las muestras en una centrífuga refrigerada Sigma 3-16K (Sartorius) a 3.850 \times r.p.m durante 30 min a 4°C. Después, se invirtió la placa que contenía las muestras para la eliminación del sobrenadante mediante centrifugación a 300 \times r.p.m durante 1 minuto. A continuación, se añadieron 100 μ l de etanol al 70% (v/v) y se centrifugaron las muestras a 3.850 \times r.p.m durante 5 minutos a 4°C. De nuevo, se eliminó el sobrenadante, centrifugando la placa invertida a 300 \times r.p.m durante 1 min. Tras este paso se dejaron las muestras a temperatura ambiente para que se produjese la evaporación de los restos de alcohol. Finalmente, las muestras se resuspendieron en 10 μ l de una solución de carga, proporcionada por el fabricante, denominada “Loading Solution” (70% Formamida, EDTA 1 mM). La electroforesis capilar y la detección de fluoresceína se realizaron en el secuenciador automático MegaBACE TM 500 (GE Healthcare). El procesado y análisis de los datos obtenidos se llevó a cabo mediante el programa MegaBACE Sequence Analyzer V.3.2. (GE Healthcare).

3.10 Síntesis de cDNA

Para la síntesis de cDNA se partió de una cantidad de 1 μ g de RNA total en un volumen final de 20 μ l. En un vial de 0,2ml se añadieron: 1 μ l de Oligo(dT)₁₂₋₁₈ (500 μ g/ml) (Invitrogen), 1 μ l de dNTPs (10mM de cada nucleótido) (Invitrogen), el volumen necesario de RNA para alcanzar 1 μ g total y agua destilada libre de RNAsas hasta 12 μ l. La mezcla se calentó a una temperatura de 65°C durante 5 minutos y

rápidamente se introdujo en hielo. Se centrifugó durante 2 segundos y se añadieron a la mezcla 4 µl del tampón 5× “First-Strand” (Invitrogen), 2 µl de Ditiotreitolo (DTT) 0,1M (Invitrogen) y 1 µl de RNaseOUT (40 unidades/ µl) (Invitrogen). Se mezclaron todos los componentes aspirando con la pipeta arriba y abajo y la mezcla se incubó durante 2 minutos a una temperatura de 42°C. Una vez transcurrido ese tiempo se añadió a la mezcla 1 µl (200 unidades) de enzima SuperScript II RT (Invitrogen) y se agitó aspirando con la pipeta arriba y abajo. Se incubaron las muestras a 42° durante 50 minutos. La reacción se inactivó calentando a 70°C durante 15 minutos.

La reacción para cada paciente se llevó a cabo por triplicado.

3.10.1 Control de síntesis de cDNA mediante PCR

Para comprobar la correcta síntesis de cDNA se amplificó un fragmento a partir de la molécula de cDNA, sintetizada a partir del RNA mensajero, del gen de la β-Actina por PCR. La secuencia genómica se obtuvo de la base de datos Ensembl y mediante el programa informático Oligo v.6.0 (MBI) se diseñaron los cebadores para amplificar el fragmento de interés.

Tabla 3.4: Cebadores para la amplificación de un fragmento del RNA mensajero de la β-Actina.

CEBADOR		PRODUCTO		
NOMBRE	SECUENCIA	pb	Th	TAMAÑO
Beta Actina D	5'-ACA CTG TGC CCA TCT ACG AGG-3'	21	60°C	621 pb
Beta Actina R	5'-AGG GGC CGG ACT CGT CAT ACT-3'	21		

Para realizar las amplificaciones, en un vial de 0,2 µl se añadieron la enzima EcoTaq DNA polimerasa (Ecogen), el tampón y el MgCl₂ correspondientes, los dNTPs (Invitrogen), los cebadores (IDT), el DNA y el agua destilada estéril hasta alcanzar un volumen final de 10 µl. Las cantidades y concentraciones finales se muestran en la tabla 3.5.

Tabla 3.5: Cantidades y concentraciones finales para la reacción de PCR.

REACTIVO	CANTIDAD (μ l)	CONCENTRACIÓN FINAL
dH ₂ O estéril	6,3	
Tampón (10X)	1	1x
dNTPs (2mM)	1	200 μ M
MgCl ₂ (50mM)	0,3	1,5 mM
Cebador directo (10 μ M)	0,2	200 μ M
Cebador reverso (10 μ M)	0,2	200 μ M
EcoTaq DNA polimerasa 5U/ μ l	0,06	0,03 U/ μ l
DNA (100ng/ μ l)	1	10 ng/ μ l

La reacción de PCR se llevó a cabo en un termociclador modelo 2720 (Applied Biosystems). Las condiciones térmicas para la amplificación del gen de la β -Actina fueron 94°C durante 2 minutos, 35 ciclos de 20 segundos a 94°C, 30 segundos a 60°C, 30 segundos a 72°C, una extensión final de 4 minutos a 72°C y finalmente 4°C ∞ . El producto de la amplificación se conservó a 4°C para su posterior uso. El resultado se comprobó por electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio en TAE 1 \times aplicando un voltaje de 94 V durante 30 minutos.

3.11 Análisis de variantes de ajuste alternativo.

3.11.1 Análisis de variantes “*in silico*”

Para el análisis “*in silico*” se utilizó la herramienta informática Splice Site Prediction Program by Neural Network (SSPNN) (ver enlaces). Este programa informático nos ayudó a encontrar sitios potenciales de ajuste en la secuencia mutada y a evaluar su fortaleza mediante la representación de una puntuación (Splice Site Score) cuyo valor máximo es igual a 1.

3.11.2 Identificación mediante clonación de los fragmentos adyacentes a los polimorfismos IVS4-16A>G y IVS6-22C>T del gen *GLA*

3.11.2.1 Obtención de bacterias competentes *E.coli* JM109 mediante CaCl_2

Partimos de una alícuota de bacterias *E.coli* JM109 (Promega) almacenada a -80°C . Las bacterias se sembraron en un vial de 50ml con 10 ml de medio de cultivo Luria Bertani (LB). El LB para 400ml de medio fue; 2g de NaCl (Sigma-Aldrich), 4g de triptona (Difco), 2g de extracto de levadura (Difco). Las bacterias se incubaron en un agitador orbital a la velocidad de $180\times\text{r.p.m}$ a 37°C durante toda la noche. A la mañana siguiente el contenido se trasvasó a un matraz de 100ml con medio LB estéril y se dejó en el agitador orbital a una velocidad de $180\times\text{r.p.m}$ a 37°C durante 2 horas. Transcurrido ese tiempo se midió la densidad óptica del cultivo en un densitómetro. Cuando la densidad óptica alcanzó el valor de 0,6 nm, se centrifugó el cultivo durante 10 minutos a 4°C y $4000\times\text{r.p.m}$ en una centrífuga 5810 R (Eppendorf). A partir de este momento todo el proceso se llevó a cabo en hielo y bajo condiciones de esterilidad a la llama. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en 8 ml de CaCl_2 50 mM. A continuación se centrifugó 10 minutos a $4.000\times\text{r.p.m}$ a 4°C de temperatura. El precipitado se resuspendió en 1,6 ml de CaCl_2 50 mM y 160 μl de glicerol y se prepararon alícuotas de 100 μl almacenándolas a una temperatura de -80°C .

3.11.2.2 Amplificación de las juntas de unión del intrón 3-4 y 5-6 del gen *GLA*

Se diseñaron una pareja de cebadores para cada amplificación mediante el programa informático Oligo v.6.0 (MBI) tomando como referencia la secuencia ENSG00000102393 extraída de la base de datos Ensembl (ver enlaces) (tabla 3.6).

Tabla 3.6: Cebadores para las amplificaciones de las juntas de los intrones 3-4, 5-6 en el gen *GLA*.

CEBADOR		PRODUCTO		
NOMBRE	SECUENCIA	pb	Th	TAMAÑO
GLAISV4D	5'- TTC GCC AGC TAG CTA ATT ATG TTC A -3'	25	54°C	215 pb
GLAISV4R	5'- GGA CAT GTG CTT ATA ACC ATC TGC C -3'	21		
GLAISV6D	5'- AGC CAA AGC TCT CCT TCA GGA TAA G -3'	25	57°C	197 pb
GLAISV6R	5'- GGG AAG CAA CTG CGA TGG TAT AAG A -3'	25		

La reacción de PCR se llevó a cabo a partir de 1 µl de cDNA de cada paciente y cada control, obtenido según el procedimiento del apartado 3.10, en un volumen final de 10 µl, siguiendo el mismo protocolo descrito en el apartado 3.10.1 exceptuando la temperatura de hibridación descrita en la tabla 3.6.

3.11.2.3 Clonaje de los amplicones obtenidos a partir del cDNA de *GLA* con el plásmido pGEM-T easy (Promega)

Para obtener el clon que nos permite posteriormente analizar las posibles secuencias alternativas adyacentes a los polimorfismos, llevamos a cabo el clonaje de los amplicones a partir del cDNA obtenido de cada paciente en el plásmido pGEM-T easy (Promega).

La mayoría de las polimerasas termoestables, que carecen de actividad exonucleasa 3'→5', añaden una adenina a cada extremo 3' del amplicón. Este hecho es de gran utilidad para la clonación de productos de PCR en vectores TA, como es el caso del pGEM-T easy (Promega). Este tipo de vectores está compuesto por las secuencias promotoras de las RNA polimerasas del fago T7 y SP6 flanqueando una región de clonación múltiple con varios sitios de restricción y un gen de resistencia a ampicilina que nos permite hacer un cribado posterior por resistencia a este antibiótico para recuperar los clones. La inserción de los amplicones en el vector se produce por la hibridación de las adeninas sobresalientes de los productos de amplificación con las timinas del vector (sistema TA) y la posterior ligación mediante la DNA ligasa T4 (3u/ µl) (Promega).

La ligación rápida de los productos de PCR con el plásmido se llevó a cabo manteniendo la relación Inserto: Vector 3:1 bajo las siguientes condiciones (tabla 3.7).

Tabla 3.7: Cantidades y concentraciones utilizadas en la reacción de ligación.

REACTIVO	CANTIDAD (μ l)	CONCENTRACIÓN FINAL
Tampón de ligación	5	1×
Vector pGEM-T (50ng/ μ l)	1	2,5 ng/ μ l
ligasa T4 DNA (3U/ μ l)	1	0,3 U/ μ l
Producto PCR	2	3,5 ng/ μ l
dH ₂ O estéril	1	

Las reacciones de ligación se incubaron durante toda la noche a 4°C para conseguir el mayor rendimiento posible.

3.11.2.4 Transformación y cultivo de bacterias competentes *E.coli* JM109

La transformación de las bacterias se realizó mediante la técnica del choque térmico. Se añadieron 10 μ l de la mezcla de ligación a una alícuota de bacterias competentes y se incubaron en hielo durante 45 minutos, seguido de 5 minutos en un termobloque a 37°C y de nuevo 30 segundos en hielo. Se añadieron 800 μ l de medio LB con ampicilina, (100 μ g/ml) (Sigma-Aldrich) y se incubó en un agitador orbital a la velocidad de 180×r.p.m a 37°C durante 1 hora. Finalmente las bacterias se sembraron en placas con medio LB-agar (Difco). Para la obtención de 500ml de medio de cultivo LB-agar (Difco) con ampicilina (100 μ g/ml) se añadieron 11,75g de LB-agar a un erlemeyer con 500 ml de agua destilada. Una vez obtenida la mezcla se esterilizó y una vez atemperada se llevó a una concentración de ampicilina de 100mg/ml. Se repartieron 20 ml de medio en cada placa Petri, de 10cm de diámetro, con esterilidad a la llama y se dejaron gelificar para su posterior uso.

Finalmente las bacterias se sembraron en las placas dejándolas crecer entre 16 y 48 horas a 37°C en una estufa de cultivo (JP Selecta). Al día siguiente se observó la aparición de colonias.

3.11.2.5 Cribado de colonias por PCR

Para asegurarnos de la correcta introducción del inserto en el plásmido realizamos un cribado de colonias mediante PCR utilizando los cebadores universales mostrados en la tabla 3.8.

Tabla 3.8: Amplificación de la zona de clonaje del plásmido pGEM-T mediante cebadores universales.

CEBADOR		PRODUCTO		
NOMBRE	SECUENCIA	pb	Th	TAMAÑO
T7D	5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3'	20	52°C	varia
Sp6R	5'-GAT TTA GGT GAC ACT ATA G-3'	19		

Para ello una vez preparado la mezcla de reacción de PCR se distribuyeron 10 µl en tantos viales de 0,2 ml como colonias queríamos comprobar, siguiendo el mismo protocolo descrito en el apartado 3.10.1 exceptuando la temperatura de hibridación descrita en la tabla 3.8. Una vez preparada y distribuida la mezcla de PCR se obtuvo la colonia con la punta de una micropipeta de 0,5-10 µl y resuspendimos la colonia en el medio de reacción para realizar la posterior amplificación.

3.11.2.6 Obtención y purificación del plásmido

Las colonias que contenían el plásmido se sembraron en viales de 50ml de fondo cónico con 10 ml de LB (Difco) con ampicilina (100 µg/ml) y se incubaron en un agitador orbital a 37°C con agitación, a una velocidad de 180×r.p.m durante 16-18 horas. Tras el cultivo, se aislaron los plásmidos de cada vial mediante el conjunto de reactivos PureLink Quick Plasmid Miniprep Kit (Invitrogen), siguiendo el protocolo marcado por el fabricante. Brevemente; se centrifugaron los viales durante 30 minutos a 3.000×r.p.m y 4°C en una centrífuga 5810 R (Eppendorf). A continuación, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en el tampón de resuspensión. Se lisó la resuspensión de bacterias y se incubaron los viales durante 5 minutos a temperatura ambiente. Una vez transcurrido ese tiempo se añadió el tampón de precipitación y se mezclaron inmediatamente por inversión. Las muestras se centrifugaron y se cargó el sobrenadante en las columnas. Se centrifugaron a una

velocidad de 12.000xg durante un minuto y se descartaron los eluidos. Se cargaron los restos de sobrenadante en la columna y se repitió el paso anterior. Una vez pasado por las columnas todos los sobrenadantes se realizaron dos pasos de lavado y se centrifugó la columna para eluir todos los restos de tampón y alcohol. Para la elución se añadieron 75 µl de H₂O ultrapura en el centro de la membrana. Se incubó a temperatura ambiente durante un minuto y se centrifugaron a 1.200xg durante 2 minutos. Se almacenó el plásmido a -20°C para su posterior aplicación.

La cantidad de DNA plasmídico obtenido se cuantificó mediante el cuantificador por fluorescencia Qubit® (Invitrogen) y el conjunto de reactivos dsDNA BR Assay 2-1000ng (Invitrogen).

3.11.2.7 Obtención de la secuencia de los insertos

El inserto fue amplificado por PCR bajo las condiciones descritas en el apartado 3.11.2.5, purificado y secuenciado como se ha descrito en apartados anteriores (ver 3.9.2).

3.11.3 Caracterización mediante la separación de fragmentos por electroforesis en geles de poliacrilamida al 6%

Para la caracterizar los transcritos por geles de poliacrilamida, se amplificó el RNA mensajero del gen *GLA* mediante PCR. Para ello se partió de 1 µl de cDNA de cada paciente y de los controles. Para la amplificación se utilizaron los cebadores descritos en la tabla 3.9.

Tabla 3.9: Cebadores para la amplificación del mensajero de gen *GLA*.

CEBADOR		PRODUCTO		
NOMBRE	SECUENCIA	pb	Th	TAMAÑO
GLA20D	5'-TGC AGC TGA GGA ACC CAG AAC TAC A-3'	25	59°C	1114 pb
GLA1113R	5'-AGG GAA GCA ACT GCG ATG GTA-3'	21		

Para realizar las amplificaciones, en un vial de 0,2 µl se añadieron los reactivos necesarios para la reacción para un volumen final de 50 µl. Las cantidades y concentraciones finales se muestran en la tabla 3.10.

Tabla 3.10: Cantidades y concentraciones finales para la amplificación del RNA mensajero del gen *GLA* por PCR.

REACTIVO	CANTIDAD (μ l)	CONCENTRACIÓN FINAL
dH ₂ O estéril	32	
Tampón (10X)	5	1x
dNTPs (2mM)	5	200 μ M
MgCl ₂ (50mM)	1,5	1,5 mM
Cebador directo (10 μ M)	1	200 μ M
Cebador reverso (10 μ M)	1	200 μ M
EcoTaq DNA polimerasa 5U/ μ l	0,84	0,03 U/ μ l
cDNA	1	

El programa térmico utilizado fue el mismo descrito en la el apartado 3.10.1, con una temperatura de hibridación de 59°C. Los productos de PCR fueron guardados a -4°C y después de su uso almacenados a -20°C. Para la realización de los geles de poliacrilamida al 6% se añadieron 2ml de Acrilamida al 30% (29:1) (Sigma-Aldrich), 1ml del tampón TBE 10 \times , 20 μ l de persulfato de amonio (APS) al 20%, 10 μ l de N,N,N,N'-tetrametilendiamina (TEMED) al 0,1% y 7ml de agua destilada. Se cargaron 5 μ l de producto de PCR en cada pocillo y las condiciones de electroforesis fueron 80 V durante 3.5 horas.

3.11.4 Identificación mediante la secuenciación del cDNA completo del gen *GLA*

Para la identificación mediante secuenciación se utilizó el amplicón obtenido en la sección 3.11.3. Para ello se realizaron diluciones (1/100.000) de los productos de PCR y se realizó una PCR anidada con los cebadores descritos en la tabla 3.11, para amplificar el molde en dos fragmentos que nos permitan el posterior análisis por secuenciación.

Tabla 3.11: Cebadores para la amplificación anidada del RNA mensajero del gen *GLA*.

CEBADOR		PRODUCTO		
NOMBRE	SECUENCIA	pb	Th	TAMAÑO
GLA20D	5'-TGC AGC TGA GGA ACC CAG AAC TAC A-3'	25	55°C	616 pb
GLA613R	5'-AGA GGC CAC TCA CAG GAG TAC AC-3'	21		
GLA497D	5'-CTG ACT GGG GAG TAG ATC TGC TAA-3'	24	55°C	637 pb
GLA1113R	5'-AGG GAA GCA ACT GCG ATG GTA-3'	21		

Para realizar las amplificaciones, en un vial de 0,2 µl, se añadieron los reactivos necesarios para la reacción, para un volumen final de 10 µl. Las cantidades y concentraciones finales son las mismas que las mostradas en la tabla 3.10 exceptuando la concentración de MgCl₂. Esta se dobló (50mM), añadiendo un volumen de 0.6µl y un volumen de dH₂O de 6µl. Los productos de PCR se analizaron según el protocolo seguido en el apartado 3.9; se purificaron según el apartado 3.9.1 y se caracterizaron según el apartado 3.9.2.

3.11.5 Clonaje de la región 3' del intrón 6 del gen *GLA*

Se clonó un fragmento de la región 3' del intrón 6 (g.100653137-g.100653189) del RNA mensajero inmaduro del gen *GLA*. Para ello se utilizó el conjunto de reactivos miScript PCR System (Qiagen). Este conjunto de reactivos está formado por tres componentes: miScript Reverse Transcription Kit; miScript SYBR Green PCR Kit y miScript Primer Assay. El sistema permite la detección y cuantificación de miRNAs y otros RNAs no codificantes. Este tipo de RNAs no están poliadenilados de forma natural durante el paso de la retro transcripción. Este conjunto de reactivos nos permite la poliadenilación de estos fragmentos mediante una polimerasa Poli(A) y la retrotranscriptasa, convierte las moléculas de RNA en cDNA apoyándose en un oligo-dt y cebadores aleatorios. La poliadenilación y la retrotranscripción están llevadas a cabo en paralelo en el mismo vial. Los cebadores Oligo-dt tienen una secuencia universal en el extremo 5' que nos permitirá su posterior amplificación por PCR o PCR cuantitativa a tiempo real. Para la obtención del cDNA se partió de 1 µg

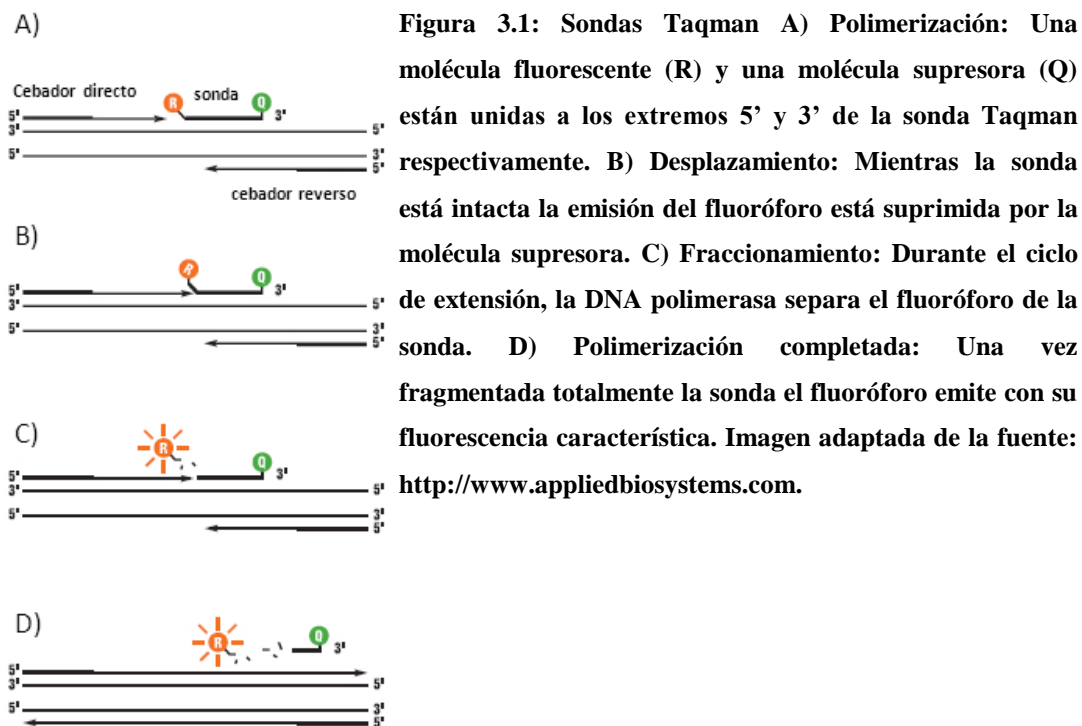
de RNA total de pacientes de la familia 1. Una vez obtenido el cDNA, a partir de 1 μ l, se amplificó la región 3' del intrón 6 por PCR utilizando los cebadores comerciales I6 MSC0000934 (Qiagen) y el miScript Universal Primer (Qiagen). Se siguieron las mismas condiciones de PCR que en el apartado 3.10.1.

Una vez obtenidos los fragmentos por PCR estos se comprobaron, se clonaron y secuenciaron como se ha descrito en apartados anteriores (3.11.2.3; 3.9.2).

3.12 Análisis de la expresión génica por PCR cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR)

3.12.1 Análisis mediante el uso de sondas TaqMan

La PCR cuantitativa es una variante que nos permite la amplificación y cuantificación a tiempo real del producto de amplificación. Las técnicas basadas en sondas específicas utilizan al menos un oligonucleótido marcado fluorescentemente. Típicamente esta sonda está unida a dos fluorocromos e hibrida en la zona intermedia entre el cebador directo y el reverso, en el amplicón. Las sondas TaqMan permiten medir la producción de productos de PCR mediante un sistema de sondas marcadas mediante dos fluorocromos. Su utilidad radica en que poseen un fluoróforo en su extremo 3' y una molécula en el 5' que bloquea su emisión de fluorescencia (supresor denominada en inglés “quencher”) y esta sonda marcada híbrida específicamente en la parte central del producto de PCR a obtener. De este modo, cuando se efectúa la PCR (con la sonda más el par de cebadores específicos), la sonda híbrida en el amplicón, pero, debido a la cercanía del fluoróforo al supresor, no se emite fluorescencia; cuando la polimerasa Taq se encuentra con la sonda, la hidroliza mediante su actividad exonucleasa 5'→3', lo cual provoca la separación del supresor del fluorocromo y, por tanto, la emisión de fluorescencia.



La cantidad de fluorescencia está relacionada con la cantidad de amplicón producido. Cada análisis Taqman se llevó a cabo en las muestras por triplicado a partir de 2 µl de cDNA diluido, obtenido según el protocolo del apartado 3.10, en una mezcla de reacción que contenía la Universal Master Mix (2X) sin AmpErase UNG (Applied Biosystems), las sondas descritas en la tabla 3.12 y H₂O ultrapura hasta un volumen final de 20 µl en las cantidades descritas en la tabla 313 para cada reacción.

Tabla 3.12: Cebadores y sondas para el estudio de la expresión del gen *GLA*.

NOMBRE (Fluoróforo)	REFERENCIA	DISEÑO
GLA wt (FAM)	Hs00609238_M1 Ref.4331182	Applied Biosystems "On demand"
GLA 2D	TGCCAAACTAACAGGGCCAC	Oligo V.7 (MBI)
GLA 2R	CCTGCCGTTTATCATAGCTAC	Oligo V.7 (MBI)
GLA2 Sonda (FAM)	AAGCCTGAGAGAGGTCGTCC	Oligo V.7 (MBI)
GAPDH (JOE)	Ref.4331182	Applied Biosystems "On demand"

Tabla 3.13: Cantidades y concentraciones finales para la amplificación del RNA mensajero del gen *GLA*, el gen *GAPDH* y el transcrito *GLA-M* por PCR cuantitativa a tiempo real.

Reactivos	<i>GAPDH</i> (μl)	<i>GLA</i> (μl)	<i>GLA-M</i> (μl)
Master Mix (2x)	10	10	10
Cebador D (10μM)	0,4	-	1
Cebador R (10μM)	0,4	-	1
Sonda (5 μM)	0,4	1 (Premezcla 20x)	1
dH ₂ O estéril	6,8	8	5
cDNA (dilución 1/10)	2	2	2

Las condiciones del programa térmico para la qPCR fueron las siguientes: 95°C durante 10 minutos, 40 ciclos de 95°C durante 15 segundos y 60°C durante 1 minuto.

La amplificación se llevó a cabo en un equipo de PCR a tiempo real, ABI PRISM® 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems). Los datos fueron obtenidos mediante el programa informático Sequence Detection Software V 1.2.3 (Applied Biosystems).

3.12.2 Rectas estándar

Se construyó una curva estándar para cada análisis de expresión génica TaqMan utilizando diluciones seriadas 1/10 de un cDNA molde por triplicado. En primer lugar se calculó el valor de C_T medio entre réplicas y su desviación estándar (DE). A continuación, se representó el \log_{10} de la cantidad de cDNA molde en cada dilución frente al C_T medio obtenido en cada caso. Seguidamente, se ajustaron los puntos a una línea recta y se determinó el coeficiente de determinación (R^2). Finalmente, se determinó la eficiencia de la amplificación (E) a partir de la pendiente de la curva estándar mediante la fórmula:

$$E=10^{-1/\text{pendiente}}$$

Se consideró que la prueba de expresión génica TaqMan estaba optimizada cuando la curva estándar era lineal ($R^2 > 0,980$), la eficiencia de la amplificación era elevada (85-105%) y la consistencia entre réplicas era buena ($DE < 0,16$).

3.12.3 Normalización de los datos

Se empleó como estándar interno el gen *GAPDH* para normalizar los datos y para controlar la variabilidad entre muestras, placas e instrumentos, así como las diferencias de pipeteo ya que su expresión en sangre periférica se considera estable.

Para cada muestra se normalizó el C_T medio de *GAPDH* mediante la fórmula:

$$E_{Gen}^{CT,Gen} / E_{GAPDH}^{CT,GAPDH}$$

Siendo, C_T : El valor del “Cycle threshold” o Ciclo umbral y E la eficiencia de amplificación. El valor de C_T es inversamente proporcional a la cantidad de DNA molde.

3.12.4 Cuantificación relativa

Utilizamos medidas de expresión génica de eficiencia corregida (Pfaffl, 2006) y los datos fueron analizados mediante el programa informático REST 2000 (Qiagen).

3.13 Búsqueda de sitios de unión a factores de transcripción en la zona promotora circundante al polimorfismo IVSO-10C>T

3.13.1 Análisis “*in silico*”

Tomando como referencia la secuencia del gen *GLA* (ENSG00000102393) de la base de datos Ensembl (ver enlaces), se realizó una búsqueda de posibles sitios de unión de factores de transcripción “*in silico*” en la zona promotora, utilizando el programa informático MatInspector (Genomatix).

3.13.2 Geles de retardo. *Electrophoretic Mobility Shift Assay* (EMSA)

Para el análisis de factores de unión nuclear “*in vitro*” se procedió a la realización de geles de retardo. Estos fueron realizados por el grupo del Profesor José Rodríguez-Rey del Departamento de Biología Molecular de la Universidad de Cantabria. (Santander). Se sintetizaron dos oligonucleótidos con la secuencia GCTGTCCGGT[C/T]ACCGTGACAA (Li-Cor Biosciences) marcados en el extremo 5' con el fluoróforo IRDye680 y su secuencia complementaria. Para la

preparación de los extractos nucleares se utilizó la línea celular de hepatocarcinoma humano Hep-G2 cultivada en medio de cultivo DMEM, 20% SFB, 1% penicilina-estreptomicina, 0,5% β -amfotericina, (Life Sciences) con una confluencia del 90%. Se incubaron los extractos nucleares, junto a las sondas y los complejos DNA-proteína, fueron sometidos a una electroforesis en gel de poliacrilamida al 5% a temperatura ambiente, en tampón Tris-boro-EDTA (TBE) 0,25 \times (Trizma Base 0,089 M; ácido bórico 0,089M; EDTA 20 mM; pH=8). Las bandas fueron analizadas en el transiluminador de luz infrarroja ODYSSEY (Li-Cor Biosciences). La afinidad relativa de cada alelo fue analizada por competencia con una cantidad creciente de sonda no marcada del alelo T. Se cuantificaron las bandas y se calcularon las afinidades representando el inverso de la intensidad de banda frente el exceso de oligonucleótido no marcado. Una pendiente elevada indicó una baja afinidad oligonucleótido-proteína.

3.14 Análisis de metilación

La técnica más usual para el análisis de metilación de DNA es el tratamiento con bisulfito. El bisulfito reacciona con las citosinas no metiladas transformándolas en uracilos mientras que las citosinas metiladas no sufren la transformación. El DNA es amplificado por PCR mediante cebadores específicos para la secuencia de DNA tratado con bisulfito y los productos pueden ser analizados por diferentes técnicas como la secuenciación, pirosecuenciación, análisis de restricción, electroforesis capilar o la fusión de alta resolución sensible a la metilación (MS-HRM).

3.14.1 Tratamiento con bisulfito

El tratamiento de DNA con bisulfito se llevó a cabo mediante el conjunto de reactivos Methylcode Bisulfite Conversion Kit (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Primero se preparó el reactivo de conversión CT teniendo en cuenta que debe estar protegida de la luz ya que es fotosensible. Se calculó la cantidad necesaria de DNA para obtener una concentración 500 ng en un volumen final de 20 μ l. Para ello se diluyeron en H₂O. A cada muestra de DNA se le añadieron 130 μ l de reactivo de conversión CT y se incubaron en un termociclador modelo 2720 (Applied Biosystems). Se realizó una etapa de desnaturalización de 10 minutos a 98°C y una etapa de conversión de 2,5 horas a 64°C. El producto de

reacción se almacenó hasta su uso, un máximo de 20 horas a 4°C. Una vez terminada la incubación se procedió a la purificación en columna y a la elución del DNA tratado. Para ello sobre la membrana de la columna se introdujeron 10 µl de tampón de elución y se centrifugó la muestra. El DNA se almacenó a -20°C hasta su posterior uso.

3.14.2 Estudio de la metilación de islas CpG de la región promotora de *GLA* (-68_+140)

3.14.2.1 Diseño y optimización de una PCR bisulfito-específica

Para el diseño de cebadores de la amplificación por PCR, del DNA tratado con bisulfito, se utilizó el programa informático MethPrimer (ver enlaces). Este programa nos da la oportunidad de predecir las islas de metilación CpG dentro de una secuencia y nos ofrece varias parejas de cebadores para realizar una amplificación específica para DNA tratado con bisulfito y para el diseño de la PCR-Metil-Específica. Para la optimización de la PCR bisulfito-específica se utilizaron una pareja de cebadores totalmente complementaria para el DNA desaminado y se utilizó una muestra de 90ng de DNA tratado y otro sin tratar. La amplificación se llevó a cabo en el termociclador Veriti® (Applied Biosystems). Este termociclador tiene la peculiaridad de que el termo bloque de 96 pocillos nos permite realizar una PCR con el mismo programa a seis temperaturas distintas, lo que facilita el trabajo de optimización de la reacción. Una vez optimizada la PCR, seleccionamos uno de los cebadores, lo marcamos con biotina y comprobamos que las condiciones funcionaban para la pareja marcada. Para cada amplificación se mezcló la enzima AmpliTaq Gold®360 DNA Polymerase (Applied Biosystems) con su tampón y el MgCl₂ administrado con la enzima, los dNTPs (Invitrogen), los cebadores correspondientes (Sigma-Aldrich), el DNA y el agua destilada estéril hasta alcanzar el volumen final de 50 µl. La polimerasa utilizada fue una enzima de tipo “hot start” que nos permite una amplificación mucho más específica. El conjunto de reactivos de esta enzima tiene un potenciador opcional compuesto por una dilución de dimetilsulfóxido (DMSO) para amplificar regiones ricas en guaninas y citosinas. Las condiciones que nos permitieron realizar una amplificación totalmente selectiva fueron las que se reflejan en las tablas 3.13 y 3.14.

Tabla 3.14: Cebadores para la amplificación bisulfito-específica de la región promotora del gen *GLA* (-68_+140).

CEBADOR		PRODUCTO		
NOMBRE	SECUENCIA	pb	Th	TAMAÑO
GLA ISV0-10D	5' GTT TTT GAG GTT AAT TTT AAA AGT TTA GGT 3'	30	57°C	208 pb
GLA ISV0-10R Biotina	5' CCA ATA CAA CCA ACC CAT AAT AAA C 3'	25		

Tabla 3.15: Cantidades y concentraciones para la PCR-bisulfito-específica de la región promotora del gen *GLA* (-68_+140).

REACTIVO	CANTIDAD (µl)	CONCENTRACIÓN FINAL
H ₂ O Estéril	29,7	
Tampón AmliTaq Gold®360 (10X)	5	1x
dNTPs (2mM)	5	200 µM
MgCl ₂ (25mM)	3	1,5 mM
Potenciador 360 GC	2	N/A
Cebador directo (10µM)	1	200 µM
Cebador reverso (10µM)	1	200 µM
AmliTaq Gold®360 DNA Polymerase 5U/µl	0,3	1,5 U/µl
DNA tratado con bisulfito (30ng/µl)	3	90 ng/µl

El programa térmico para la reacción de PCR-bisulfito-específica fue el siguiente: 95°C durante 10 minutos, 40 ciclos de 95°C durante 30 segundos, 57°C durante 30 segundos, 72°C durante 60 segundos, una extensión final de 72°C durante 7 minutos y a 4°C ∞. Los productos de PCR fueron comprobados por electroforesis en gel de agarosa.

3.14.2.2 Análisis de metilación por pirosecuenciación

La pirosecuenciación es una técnica de secuenciación basada en la secuenciación por síntesis, acoplando la síntesis de DNA a una reacción quimioluminiscente, lo que permite una rápida determinación de secuencias a tiempo real. La técnica utiliza cuatro reacciones enzimáticas que tienen lugar en un único tubo en el que se monitoriza la síntesis de la cadena complementaria de DNA usando como molde DNA de cadena simple. Los nucleótidos son añadidos de forma consecutiva a la reacción y, en caso de incorporación, se libera pirofosfato inorgánico (PPi). PPi desencadena una serie de reacciones que resultan en la producción de luz, de forma proporcional a la cantidad de DNA y el número de nucleótidos incorporados. La generación de luz se detecta en forma de pico y se graba gracias a un sistema de detección, reflejando la actividad de las enzimas en la reacción. Al ser un método cuantitativo, podemos cuantificar la cantidad de metilación en relación a la cantidad de DNA transformado en el tratamiento con bisulfito.

Para ello se diseñaron una pareja de sondas para la reacción de pirosecuenciación (tabla 3.15) que nos permitían cubrir todo el fragmento amplificado por PCR. Para el diseño de los cebadores se utilizó el programa informático PSQ Assay Design (Qiagen).

Tabla 3.16: Características de las sondas para el análisis por pirosecuenciación.

SONDAS PARA LA REACCIÓN DE PIROSECUENCIACIÓN		
NOMBRE	SECUENCIA	pb
ISV01seq	5'-TTT TAA AAG TTT AGG TTA TT-3'	20
ISV03seq	5'-ATT TAG AAT TAT ATT TGG GT-3'	20

3.14.2.3 Preparación de las muestras y análisis de la metilación

Para el análisis de metilación por pirosecuenciación se utilizó el equipo de reactivos PyroMark Gold Q96 Reagents (5 x 96) (Qiagen). Se partió de 25 µl de PCR marcada con biotina (ver apartado 3.14.2.1) y el experimento se realizó por triplicado. Primero, por cada muestra, se mezclaron 40 µl de tampón de unión con 3 µl de esferas de sefarosa-estreptavidina “Streptavidin Sepharose High Performance” (Invitrogen) y 1,6 µl de cada sonda de secuenciación (10 µM) con tampón de hibridación hasta llegar a un volumen de 40 µl por muestra. Se añadieron 43 µl de la mezcla de esferas de sefarosa-streptavidina con tampón de unión a las muestras y agitamos la mezcla en un agitador de placas durante 15 minutos a 1.400×r.p.m. Preparamos una placa de reacción (PSQ 96 Sample plate) con la mezcla de sondas de secuenciación y tampón de hibridación añadiendo 40 µl de la mezcla. Se preparó la mesa de vacío (figura 3.2) con agua ultrapura, etanol 70% (V/V), solución desnaturalizante (0,2M NaOH) y tampón de lavado, utilizando las condiciones descritas por el fabricante.

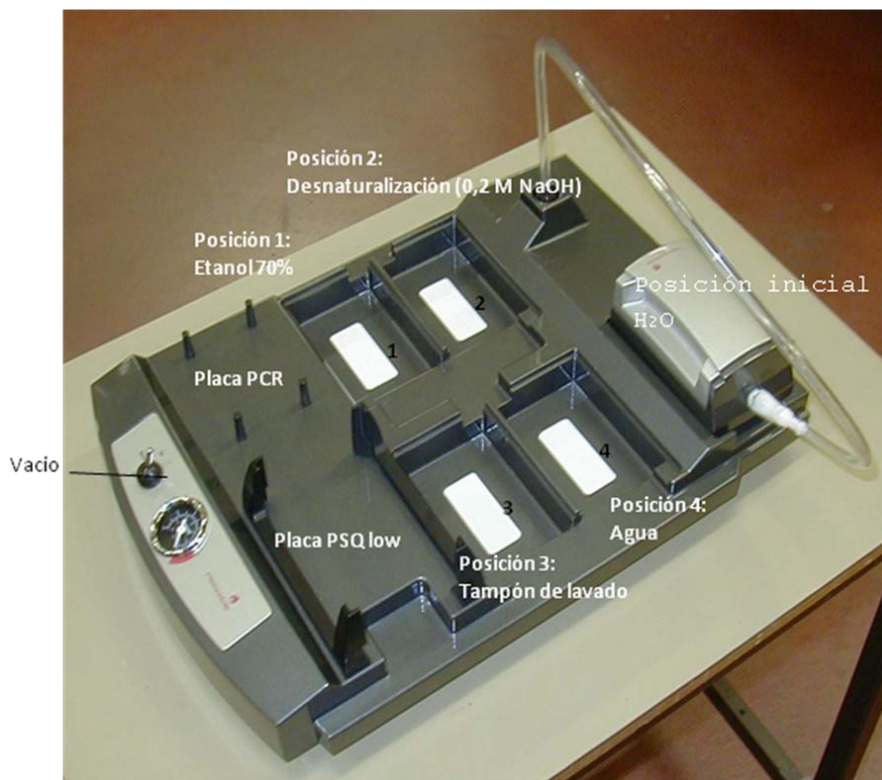


Figura 3.2: Mesa de vacío para la preparación de muestras.

Brevemente; se aplicó el vacío a la unidad de 96 filtros dejando aspirar agua durante 20 segundos. Se aspiraron las muestras con los filtros y se pasaron por la posición 1 durante 5 segundos. Transcurrido ese tiempo se pasaron los filtros con la muestra por la posición 2 durante 5 segundos y por último se pasó la unidad por la posición 3 otros 5 segundos. Se desconectó el vacío, se introdujeron las muestras en la placa y se dejó la unidad de filtros en la posición 4. La placa se incubó durante 2 minutos a 80°C y se introdujo en el pirosecuenciador. Los datos fueron analizados según el programa informático Pyro Q-CpG Software (Biotage).

3.15 Determinación de la inactivación del cromosoma X mediante electroforesis capilar metil-específica

3.15.1 Diseño y optimización de PCR-metil específica

Para determinar la actividad del cromosoma X mediante electroforesis capilar metil-específica se diseñó y optimizó una PCR sensible a la metilación, para amplificar una región del receptor de andrógenos HUMARA (Edwards, et al., 1992, Kuiper, et al., 1989, Tilley, et al., 1989). Para el diseño de cebadores se utilizó el programa informático MethPrimer (ver enlaces). La reacción de PCR se optimizó para que la amplificación fuera específica al DNA tratado con bisulfito no metilado. Para ello se utilizó una muestra de DNA sin tratar, una muestra de DNA tratado con bisulfito y como controles se utilizó el conjunto de reactivos Cells-to-CpG Methylated and Unmethylated gDNA Control Kit (Applied Biosystems) tratado con bisulfito. Este producto está formado por una alícuota de DNA humano procedente de un varón 100% y 0% metilado (100ng/μl). Para la optimización se amplificaron por PCR una alícuota de cada muestra a distintas temperaturas mediante el termociclador Veriti (Applied Biosystems) de tal manera que solo amplificase el DNA tratado con bisulfito 0% metilado. Una vez optimizadas las condiciones se marcó el cebador reverso con el fluoróforo FAM y se comprobó que la amplificación seguía optimizada. Los cebadores, reactivos y condiciones para un volumen final de 10 μl de PCR están representados en las tablas 3.16 y 3.17. Las condiciones térmicas para la amplificación metil-específica fueron: 95°C durante 10 minutos, 40 ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 57°C, un minuto a 72°C, una extensión final de 7 minutos a 72°C y finalmente a 4°C ∞.

Tabla 3.17: Cebadores para la amplificación específica de DNA no metilado tratado con bisulfito.

CEBADOR		PRODUCTO		
NOMBRE	SECUENCIA	pb	Th	TAMAÑO
ARDU	5'-GTG TGT GAA GTG ATT TAG AAT TTG G-3'	25	57°C	236pb
ARRU (FAM)	5'-AAA TAA CCT ATA AAA CCT CTA CAA T-3'	25		

Tabla 3.18: Cantidades y concentraciones para la reacción de PCR-metil-específica.

REACTIVO	CANTIDAD (μl)	CONCENTRACIÓN FINAL
H ₂ O Estéril	6,4	
Tampón AmliTaq Gold®360 (10X)	1	1x
dNTPs (2mM)	1	200 μM
MgCl ₂ (25mM)	0,6	1,5 mM
Cebador directo (10μM)	0,2	200 μM
Cebador reverso (10μM)	0,2	200 μM
AmliTaq Gold®360 DNA Polymerase 5U/μl	0,1	0,5 U/μl
DNA tratado con bisulfito (50 ng/μl)	0.5	25 ng/μl

3.15.2 Electroforesis capilar

Los fragmentos fueron analizados en el secuenciador 3500 XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Para ello, se añadieron 0.8 μl de producto de PCR (apartado 3.15.1) diluidos en una proporción 1/20 en agua destilada ultrapura, 0.2 μl de marcador de tamaño molecular LIZ 600 (Applied Biosystems) y 9 μl de formamida (Applied Biosystems). Una vez preparadas las muestras se incubaron a 80°C durante

2 minutos con objeto de eliminar las posibles estructuras secundarias. Las muestras se sometieron a electroforesis capilar en las condiciones indicadas en la tabla 3.18.

Tabla 3.19: Condiciones de electroforesis capilar para el genotipado de HUMARA y la cuantificación de la metilación del cromosoma X.

	DURACIÓN	VOLTAJE
INYECCIÓN	7 minutos	12 kV
INTERVALO DE INYECCIÓN MÚLTIPLE	100 segundos	9 kV
SEPARACIÓN CAPILAR	50 minutos	6 kV

El análisis de los datos se llevó a cabo con el programa GeneMapper V4.1 (Applied Biosystems).

3.16 Medidas de la actividad de la enzima α -galactosidasa A

3.16.1 Medida de la actividad enzimática en muestras de plasma y leucocitos

Las actividades de α -galactosidasa A fueron medidas en muestras de plasma y en concentrados de leucocitos según el protocolo descrito previamente (Mayes, et al., 1981). Brevemente; se incubaron 20 μ g de proteína total extraída a partir de un precipitado de las leucocitos de sangre periférica a 37°C durante una hora en 120 μ l de mezcla de reacción que contenía: 4-metilumbeliferil- α -D-galactopiranosido (Biosynth) a una concentración de 3,5mM disuelto en tampón citrato-fosfato pH=4,6; en presencia de 100 mM de *N*-acetilgalactosamina (Sigma-Aldrich) como inhibidor de la actividad de la α -*N*-acetilgalactosaminidasa. Las reacciones se inhibieron mediante la adición de 2,5ml de tampón glicina-NaOH 300mM a pH=10,6 y se midió la fluorescencia emitida por el sustrato sintético metabolizado mediante un fluorímetro RF-1501 (Shimadzu) a unas longitudes de onda de 366/445 nm.

La medida de la actividad enzimática en plasma se llevó a cabo incubando 50 μ l de plasma a 37°C durante 2 horas en una mezcla de reacción con un volumen de 300 μ l que contenía 1,75 μ mol de 4-metilumbeliferil- α -D-galactopiranosido (Biosynth) disuelto en tampón citrato-fosfato pH=4,6. Las reacciones se inhibieron mediante la adición de 3 ml de tampón glicina-NaOH 300mM a pH=11 y la fluorescencia fue

medida de la misma forma que en el protocolo para células. Las medidas de fluorescencia se interpolaron en la siguiente recta (figura 3.3).

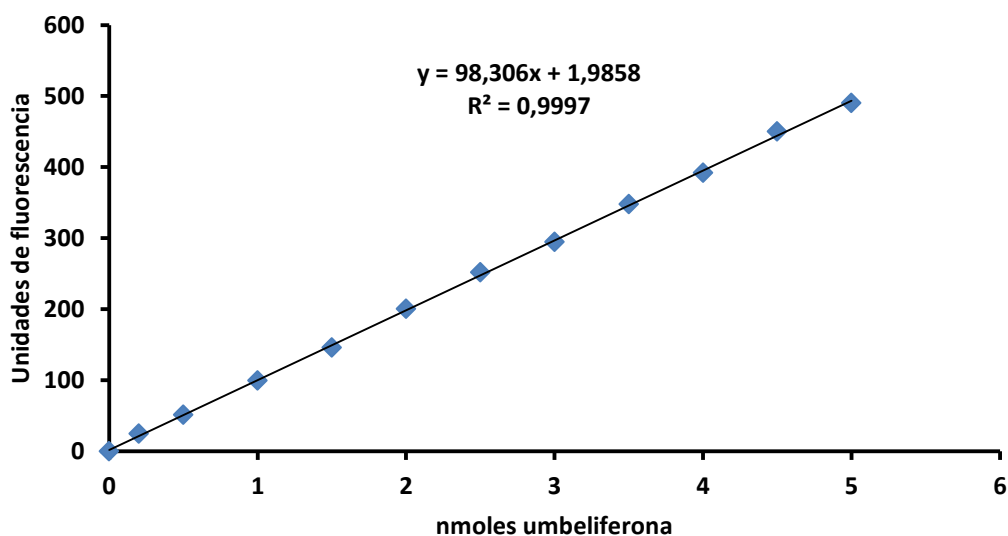


Figura 3.3: Recta de calibrado del sustrato fluorogénico umbeliferona en leucocitos y plásmas.

3.16.2 Medida de la actividad enzimática en cultivos primarios de fibroblastos

Para realizar la medida de la actividad enzimática en cultivos primarios de fibroblastos, se tomaron dos alícuotas de un volumen de 50 μ l de extracto celular de cada cultivo, preparado para la medida de concentración de Gb₃ (ver apartado 3.20). Una vez se habían separado las alícuotas, se congelaron a -20°C y se mantuvieron hasta el análisis enzimático. Para llevar a cabo el análisis se utilizó el mismo protocolo que para muestras de plasma y leucocitos (ver apartado 3.16.1). Los experimentos se realizaron por triplicado.

3.17 Medida de citoquinas proinflamatorias en plasma.

Se analizaron las concentraciones de 8 citoquinas en muestras de plasma, (IL4, IL6, IL7, IL10, IL13, MIP1 α , MIP1 β y TNF α) mediante la plataforma de citometría de flujo por fluorescencia, LABScan 100 (Luminex), utilizando el conjunto de reactivos human Procarta® Cytokine Assay Kit (Affymetrix), siguiendo las recomendaciones del fabricante con alguna modificación sobre el protocolo original. Brevemente, se partieron de 25 μ l de plasma. Las muestras de plasma se descongelaron a 4°C, se agitaron con el agitador mecánico y se centrifugaron a velocidad máxima durante 5

minutos para eliminar los posibles restos de fibrina. Antes de empezar se dejaron los reactivos a temperatura ambiente. Se reconstituyeron los estándares de antígeno liofilizado y se prepararon ocho diluciones seriadas (1/4) para calibrar el proceso. Se substituyó la placa de 96 pocillos con filtro por una placa de 96 pocillos con fondo en U para poder utilizar el método “flick” en los pasos de lavado. Para ello en cada paso de lavado se centrifugó la placa a máxima velocidad durante 5 minutos y mediante un golpe seco, se vació el sobrenadante quedando las “micro esferas” adheridas al fondo del pocillo. Sin invertir la placa se puso sobre papel secante para eliminar el sobrante de líquido y poder continuar con el siguiente paso. Se añadieron a la placa las esferas de poliestireno con los diferentes anticuerpos y se realizó el lavado correspondiente. Seguidamente se añadió sobre las esferas el tampón específico de plasma. Se añadieron los estándares y las muestras por duplicado. Se agitó la placa en un agitador de placas durante 30 minutos a temperatura ambiente y se incubó a 4°C durante toda la noche. Al día siguiente se agitó la placa de nuevo durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se realizaron 3 pasos de lavado y se añadieron los anticuerpos de detección. La placa se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos en un agitador de placas a una velocidad de 500×r.p.m. Se lavó la placa y se añadió el conjugado de streptavidina-ficoeritrina. Tras una incubación de 30 minutos se lavó la placa y las muestras se resuspendieron en el líquido del sistema. Los resultados fueron analizados mediante el software xPONENT 3.1 (Luminex)

3.18 Cultivo y mantenimiento de las líneas primarias de fibroblastos humanos

Tras la obtención de la biopsia de piel (apartado 3.4) se procedió al procesamiento de la muestra para la obtención y el cultivo de fibroblastos primarios. Todo el material que se utilizó estaba en condiciones estériles. El medio de cultivo estaba constituido por: DMEM con glutamax 1X (Gibco), 20% SFB (Gibco), 1% penicilina-estreptomomicina (Gibco), 0,5% β -amfotericina (Gibco) con colagenasa de tipo II (4mg/ml) (Sigma-Aldrich) en una proporción 6:1. La mezcla se esterilizó mediante el paso por un filtro de membrana de acetato de celulosa, con un poro de 0,2 μ m (Millipore), en un vial de 15 ml. Las muestras potencialmente contaminadas se desinfectaron sumergiéndolas durante 5 segundos en etanol al 70% (V/V). La biopsia

se transfirió a una placa Petri y utilizando un bisturí, se separó la epidermis de la dermis y el tejido adiposo para evitar la contaminación, básicamente de queratinocitos. Una vez separada la dermis se cortó en fragmentos milimétricos y se introdujo en el vial de la mezcla de medio con colagenasa. La muestra se incubó en una estufa a 37°C durante toda la noche. Al día siguiente se centrifugó la muestra a alta velocidad 1.500×g durante 10 minutos de modo que el sedimento se compactase. Se eliminó el sobrenadante, se resuspendió en tampón fosfato salino (PBS) 1× pH=7,4 y se centrifugó a una velocidad de 1.500×g durante 5 minutos. El sedimento se resuspendió en 1 ml de medio y se transfirieron 500 µl a 2 frascos de cultivo (25 cm²) que contenían 1,5 ml de medio. Los frascos se incubaron en la estufa en una atmósfera del 5% de CO₂ a 37°C durante una semana, antes de realizar el primer cambio de medio, con objeto de que las células se adhiriesen al frasco. Se cambió el medio a la semana previo lavado con 3 ml de PBS 1X y se fue realizando un cambio de medio cada 4 días hasta que el cultivo llegó a la confluencia máxima.

3.18.1 Subcultivo de fibroblastos

Para realizar el subcultivo se decantó el medio y se lavó el frasco con 3 ml de PBS 1X. Se añadieron 2 ml de una solución de tripsina al 0.05% en Na₄EDTA 0.53mM (Gibco) y se dejaron los frascos en la estufa a 37°C durante 5 minutos. Trascorrido ese tiempo se observaron al microscopio para comprobar si se habían despegado del fondo del frasco. Si no se habían despegado del todo se le dieron unos golpes leves al lateral del frasco para facilitar la suspensión de las células. Se añadieron 2 ml de medio con objeto de neutralizar la tripsina y se sembró la mitad en un frasco de 25 cm². El resto se apartó para congelar según se describe en el apartado 3.18.2. En el frasco y en la alícuota congelada, se hizo constar el tipo celular, el código de muestra, el número de pase (cada vez que se tratan las células con tripsina debe constar un pase más), la densidad y la fecha. Se renovó el medio cada 4 días hasta que llegar a la confluencia y se repitió el subcultivo.

3.18.2 Congelación de células

En cada subcultivo una vez alcanzada la confluencia y sembrada la cantidad correspondiente en cada frasco (véase 3.18.1) se congelaron alícuotas de células. Para ello, la muestra a congelar, se centrifugó a una velocidad de 1.200×r.p.m

durante 5 minutos. Se decantó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en SFB/DMSO en una proporción 9:1. Se almacenó 1ml de suspensión para cada alícuota en viales criogénicos estériles (Nunc) que fueron congelados a -80°C en un contenedor Cryo 1°C Freezing Container, "Mr. Frosty" (Thermo) con isopropanol absoluto (Sigma-Aldrich) para su correcta criopreservación. Finalmente fueron almacenados en nitrógeno líquido. El número de alícuotas en cada caso estuvo en dependencia de la densidad celular.

3.18.3 Descongelación de células

Para descongelar las células, se colocaron los viales en un baño de agua termostaticado a 37°C hasta que se descongelaron por completo y rápidamente, el contenido del vial se transfirió a un vial de 15 ml con 5 ml de PBS $1\times$. El vial se centrifugó a $1.200\times\text{r.p.m}$ durante 5 minutos y se decantó el sobrenadante. El precipitado se resuspendió en 1 ml de medio de cultivo completo y se sembró en un frasco de 25 cm^2 con 3ml de medio de cultivo completo.

3.19 Análisis de la proliferación celular en fibroblastos

Para la valoración del crecimiento celular se utilizó el reactivo Alamar Blue (Invitrogen). Este reactivo está compuesto por el colorante químico resazurina, un colorante azul no fluorescente que por la reducción química producida por el metabolismo celular, se transforma a resorufina, una molécula que emite fluorescencia roja. La reducción del compuesto es directamente proporcional al número de células, proporcionándonos una forma de cuantificar el crecimiento celular y la toxicidad de fármacos de una manera rápida y sencilla.

Se utilizaron células de los portadores del HCl: F1.1, F1.3, F1.4; de los portadores de la mutación G183V: F2.1, F2.3 y un control sano. Todas las células estaban comprendidas entre pase 7 y 9. Las células se sembraron a una densidad de 4.000 células/cm² en placa de 96 pocillos (TPP) en un volumen de 200 μl de medio DMEM con glutamax 1X (Gibco), 10% SFB de complementado (Gibco), 1% penicilina-estreptomocina (Gibco), 0,5% β -amfotericina (Gibco). Por cada paciente se sembraron 8 pocillos. A las 8 horas de realizar la siembra, se añadieron 20 μl por pocillo del reactivo Alamar Blue (Invitrogen) y se dejó metabolizar el reactivo por

las células incubándolo en la estufa de CO₂ a 37° durante cuatro horas. Una vez transcurrido el tiempo, se tomaron las medidas de fluorescencia en el lector de placas Synergy HT (Biotek) a las longitudes de onda de 530/590 nm (excitación/emisión). Estas medidas de fluorescencia se refirieron a tiempo cero. El medio de cultivo fue repuesto cada 4 días. Se tomaron medidas a las 24 horas, 3, 6, 10 y 14 días del cultivo, del mismo modo que para tiempo cero.

3.20 Medida del acúmulo de galacto/glucoesfingolípidos en cultivos primarios de fibroblastos humanos

3.20.1 Cultivo de fibroblastos

Los fibroblastos humanos fueron cultivados en frascos de cultivo de 175 cm² en medio: DMEM con glutamax 1X (Gibco), 10% SFB de complementado (Gibco), 1% penicilina-estreptomina (Gibco), 0,5% β -amfotericina (Gibco). Es importante para realizar los experimentos utilizar SFB de complementado con objeto de desnaturalizar la α -galactosidasa que está presente en el suero ya que podría interferir en los resultados finales. Para ello se calentó el SFB en un baño húmedo a una temperatura de 56°C durante 30 minutos. Las células se incubaron en una estufa a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5% hasta llegar a la confluencia máxima renovando el medio cada 72 horas. Una vez llegada a la confluencia se mantuvieron en estado quiescente durante 5 días. Se lavaron con PBS 1× y se trataron con 10 ml de una solución de tripsina al 0.05% en Na₄EDTA 0,53mM (Gibco) y se dejaron los frascos en la estufa a 37°C durante 5 minutos. La suspensión celular, se neutralizó con 10 ml de medio completo y se centrifugó a una velocidad de 1.200×r.p.m durante 5 minutos, en un vial de 50 ml. Se decantó el sobrenadante y el precipitado se lavó con PBS 1×. Se centrifugó de nuevo el vial con las mismas condiciones que en el paso anterior y el precipitado se almacenó a una temperatura de -20°C.

3.20.2 Obtención del lisado celular

Para la obtención del lisado celular se resuspendieron los precipitados celulares en un volumen de 800 μ l de taurocolato Sódico al 1% (Sigma-Aldrich) mediante la pipeta aspirando arriba y abajo. Las muestras se mantuvieron siempre en hielo durante todo el proceso. Para lisar las membranas celulares se utilizó un sonicador Vibra Cell

75186 (Bioblock Scientific) y se aplicó el siguiente programa a una potencia de 40 vatios.

Activar ultrasonido	20 segundos		15 segundos		10 segundos		10 segundos
Descanso en hielo		30 segundos		30 segundos		30 segundos	

Entre cada muestra se lavó la punta del equipo de ultrasonidos con agua destilada. Una vez se lisaron los precipitados, se centrifugaron los extractos celulares a una velocidad de 1.000×r.p.m durante 10 minutos a una temperatura de 4°C. El sobrenadante se recuperó con cuidado, con objeto de no perturbar el precipitado. Se cuantificaron las concentraciones de proteína total mediante el espectrofotómetro Nanodrop 2000C (Thermo) midiendo la absorbancia a 280 nm. Separamos dos alícuotas de 50 µl para analizar la actividad enzimática (ver apartado 3.16.2) y otra de 700 µl para cuantificar el acúmulo de glucoesfingolípidos.

3.20.3 Extracción lipídica y análisis por HPTLC

La extracción lipídica de los extractos celulares de cultivos de fibroblastos y el análisis de los lípidos por la técnica de cromatografía de alto rendimiento en capa fina (HPTLC) fue realizada en el Departamento de Química Analítica de la Universidad de Zaragoza.

Primero se procedió al tratamiento de la muestra para aislar los lípidos de los extractos celulares. Se partió de alícuotas de un volumen de 500 µl de extracto a la cual se le añadieron 2ml de una mezcla de CHCl₃/MeOH (1:1 V;V) (Sigma/Scharlau) y se agitó la mezcla durante 30 minutos. Posteriormente se centrifugó a una velocidad de 5.000×r.p.m durante 10 minutos para favorecer la separación de las fases. Se obtuvo la fase superior y se añadieron 150 µl de NaOH (2M) (Scharlau) para producir una hidrólisis básica. La reacción se mantuvo durante dos horas a 40°C en agitación constante. Transcurrido el tiempo se adicionaron 16 µl de ácido acético (Poch), 2 ml de H₂O y otros 2ml de MeOH a la mezcla de reacción para favorecer la separación de fases. Se tomó la fase inferior con una jeringa de 1

ml, eliminando previamente la mayor parte de la fase superior con ayuda de una pipeta pasteur. Una vez aislada la fase inferior, se llevó a sequedad con nitrógeno. Los extractos obtenidos tras el secado se reconstituyeron con 500 μ l de $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$.

Se inyectaron 50 μ l de cada muestra en las placas y para los patrones se utilizaron 3 μ g de cada uno. Como patrones del análisis se utilizaron: Esfingomielina (Sigma); Globotriaosilceramida (Matreya); Lactosilceramida (Matreya) y Glucosilceramida (Sigma).

La cromatografía se realizó en placas HPTLC de vidrio de 10 x 10 y 20 x 10 cm, recubiertas con sílica (Merck). La siembra de las muestras se realizó en bandas de 3 mm mediante el uso de un aplicador semiautomático Linomat IV (Camag). El desarrollo cromatográfico fue llevado a cabo por el "Automated Multiple Development 2" (AMD 2) (Camag) que nos permitió realizar cromatografía en gradiente de un modo automatizado. El gradiente aplicado estaba basado en mezclas $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$. Las lecturas se realizaron por densitometría. Para ello se utilizó un densitómetro TLC Scanner 3 (Camag) con un rango de λ comprendido entre 190 y 800 nm. Las placas se revelaron en sulfato de cobre y se realizó el barrido a una λ de 620 nm.

3.21 Análisis de la toxicidad para 5-azacitidina (AzaC) en fibroblastos

Se preparó una suspensión celular de fibroblastos (20.000 células/ml) en medio de cultivo DMEM con glutamax 1X (Gibco), 10% SFB de complementado (Gibco), 1% penicilina-estreptomicina (Gibco), 0,5% β -amfotericina (Gibco) y se transfirieron 100 μ l de esa suspensión por pocillo a una placa de 96 pocillos (TPP). Se sembraron las columnas de la placa, necesarias para testar el rango de concentraciones de 25 μ M, 12,5 μ M, 6,25 μ M, 3,125 μ M y 0 μ M en cinco filas. La placa se incubó en una estufa a 37°C en una atmósfera de CO_2 durante 24 horas. Se decantó el medio de cultivo y se lavaron los pocillos con 50 μ l de PBS 1 \times . Se preparó una disolución de medio completo con una concentración de 5-azacitidina de 25 μ M (Sigma-Aldrich) y se transfirieron 200 μ l de esa dilución a la primera columna. Las siguientes columnas fueron provistas con 100 μ l de medio completo. Se realizaron diluciones seriadas transfiriendo 100 μ l desde la primera columna a la siguiente resuspendiendo con la

pipeta arriba y abajo excepto en la última columna que fue la columna control manteniendo el volumen final de 100µl. La placa se incubó en una estufa a una temperatura de 37°C en una atmósfera de CO₂ durante 72 horas y se añadieron 10 µl de Alamar Blue (Invitrogen). Se volvió a incubar la placa en la estufa durante 4 horas y se tomaron las medidas de fluorescencia en el lector de placas Synergy HT (Biotek) a las longitudes de onda de 530/590 nm (excitación/emisión).

3.22 Efecto del tratamiento con 5-azacitidina en cultivos primarios de fibroblastos

Para medir el efecto del tratamiento del fármaco hipometilante 5-azacitidina (Sigma-Aldrich) en cultivos de fibroblastos primarios se partió de un cultivo por duplicado de células en placa de 175 cm² de los portadores de la familia 1: F.1.1, F1.4; de la familia 2: F2.1, F2.3 y un control mujer. Todas las líneas celulares estaban entre el pase 7 y 9. Las células se mantuvieron en cultivo durante una semana. Trascorrido ese tiempo se decantó el medio y se lavaron con 5 ml de PBS 1×. Se decantó el PBS y se trataron con 10 ml de una solución de tripsina al 0,05% en Na₄EDTA 0,53mM (Gibco) y se dejaron los frascos en la estufa a 37°C durante 5 minutos. Cuando estuvieron todas las células en suspensión se añadieron 10 ml de medio de cultivo para neutralizar la tripsina y se recogieron las células en suspensión sobre un vial de 50 ml. Los viales se centrifugaron a una velocidad de 1.500×r.p.m durante 5 minutos y se decantó el sobrenadante con cuidado de no perturbar el precipitado. El precipitado se resuspendió en 2 ml de PBS y se tomó una muestra diluida 1/10 para contar el número de células mediante el contador automático Scepter 2.0 Handheld Automated Cell Counter (Millipore). Una vez realizado el conteo se sembraron 160.000 células por pocillo (80% de confluencia) en 9 pocillos por portador en placas de cultivo del tipo T6 (TPP). Por cada pocillo se añadieron 1,5 ml de medio DMEM con glutamax 1X (Gibco), 10% SFB de complementado (Gibco), 1% penicilina-estreptomina (Gibco), 0,5% β-amfotericina (Gibco).

A las 24 horas se cambió el medio por el medio suplementado con fármaco a distintas concentraciones y medio únicamente con el diluyente del fármaco. Para preparar el medio se partió de una disolución de 5-azacitidina en una mezcla ácido acético/agua (1:1) a una concentración de 5mg/ml. Seguidamente se prepararon 50ml

de medio con fármaco a una concentración de 12,5 μ M. 50 ml de medio a una concentración de 6,25 μ M y 50 ml en los que se puso únicamente la misma cantidad de acético/agua (1:1) que en el vial de fármaco más concentrado como control (0 μ M). Por cada sujeto se pusieron 2ml de medio sin el fármaco, 2ml de medio con fármaco a 6,25 μ M y 2ml de medio con fármaco a 12,5 μ M. Cada caso se realizó por triplicado teniendo en cultivo un total de 9 pocillos por sujeto.

Los cultivos con el fármaco se mantuvieron un total de 72 horas antes de recoger las células. Trascorrido ese tiempo se decantaron los medios. Cada pocillo se lavó con 1 ml de PBS 1 \times y se añadieron 2 ml de tripsina. Se incubaron en la estufa a 37° grados durante 5 minutos y una vez las células quedaron en suspensión, se neutralizó la tripsina con 2 ml de medio y se unificaron las células crecidas por triplicado en un mismo vial de 15ml quedando por cada sujeto 3 viales que contenían los cultivos con el control y las dos concentraciones de fármaco. Los viales se centrifugaron durante 5 minutos a 1.500 \times r.p.m y se decantaron los medios. Las células se resuspendieron en 900 μ l de PBS 1 \times y se obtuvieron alícuotas de 300 μ l recogidas en viales de 1,5 ml. Los viales se centrifugaron a una velocidad de 1.500 \times r.p.m durante 5 minutos, se decantó el sobrenadante y los precipitados se guardaron seguidamente a una temperatura de -80° para su posterior uso en diferentes experimentos.

3.22.1 Análisis del perfil de activación del cromosoma X en cultivos primarios de fibroblastos bajo la acción de la 5-azacitidina

Para realizar el análisis del perfil de activación del cromosoma X en cultivos primarios de fibroblastos bajo la acción del fármaco 5-azacitidina, se partió de muestras del DNA aislado según el protocolo descrito en el apartado 3.6.2 a partir de una de las alícuotas de células de cada sujeto cultivadas bajo la acción de dos concentraciones de fármaco y su control (0 μ M, 6,25 μ M, 12,5 μ M) según el protocolo descrito en el apartado 3.22. El DNA extraído se trató con bisulfito sódico mediante el conjunto de reactivos Methylcode Bisulfite Conversion Kit (Invitrogen) siguiendo el protocolo descrito en el apartado 3.14.1. En este caso se partió de una concentración de DNA de 240 ng por muestra en vez de 500 ng como está descrito en la sección, para determinar el patrón de activación en DNA de sangre periférica.

Una vez se obtuvo el DNA tratado, se procedió al análisis de la activación del cromosoma X para cada muestra siguiendo el protocolo del apartado 3.15.

3.22.2 Análisis de la expresión del gen *GLA* en cultivos primarios de fibroblastos bajo la acción de la 5-azacitidina

Para analizar el efecto del fármaco sobre la expresión del gen *GLA* se extrajo el RNA de las diferentes alícuotas de células cultivadas a diferentes concentraciones (0 μ M, 6,25 μ M, 12,5 μ M) de cada sujeto siguiendo el protocolo descrito en el apartado 3.7.2. Una vez aislado el RNA de las células se procedió a la síntesis del cDNA mediante el conjunto de reactivos PrimeScriptTM RT reagent Kit (Perfect Real Time) (Takara) siguiendo las recomendaciones del fabricante para realizar posteriormente el análisis de expresión con sondas TaqMan. Brevemente, se partió de una cantidad inicial de 150 ng de RNA por cada reacción y se utilizó la mezcla de cebadores aleatorios (100 μ M) y oligo dT (50 μ M) para una mejor síntesis de nuestro transcrito. La reacción se llevó a cabo en un volumen de 10 μ l. Se incubó a 37°C durante 15 minutos y la reacción se inactivó por calor a 85°C durante 5 segundos. Posteriormente se mantuvo el cDNA a 4°C. Para comprobar que la retrotranscripción había salido según lo previsto se amplificó por PCR un fragmento del gen de la β -Actina según el protocolo descrito en el apartado 3.10.1. La retrotranscripción se realizó por triplicado.

La expresión del gen *GLA* se analizó mediante la PCR cuantitativa con alguna variación con respecto al protocolo del apartado 3.12. Se partió de 1 μ l de cDNA sin diluir en un volumen final de 10 μ l. Para ello se utilizó la mitad de reactivos que la utilizada en la tabla 3.13 y se analizó por una parte la sonda de *GLA*-M y por otro lado en el mismo pocillo se introdujo la sonda para medir *GLA* y *GAPDH*, ya que al estar marcadas con fluoróforos distintos (FAM y JOE) nos permitía esa posibilidad. La mezcla de reactivos (“Master Mix”) que se utilizó en estos experimentos fue la Fast Start Universal Probe Master (ROX) de Roche. En este caso se dio como válida una consistencia entre réplicas de ($DE < 0,34$) y los datos fueron analizados bajo el método $R = 2^{-\Delta\Delta Ct}$.

3.22.3 Análisis de la actividad enzimática de la α -galactosidasa A en cultivos primarios de fibroblastos bajo la acción de la 5-azacitidina

El análisis de la actividad enzimática en los cultivos tratados con diferentes cantidades de AzaC, se llevó a cabo a partir de los precipitados de células obtenidas a partir de los diferentes cultivos. El primer paso que se llevó a cabo fue la obtención de los extractos celulares. Para ello se siguió el protocolo detallado en el apartado 3.20.2 con las siguientes variaciones. Los precipitados se resuspendieron en 300 μ l de taurocolato al 1% y todo el proceso se llevó a cabo en hielo. Posteriormente se fragmentaron mediante ultrasonidos, se centrifugaron, se cuantificó la cantidad de proteína y los extractos se congelaron a -20°C . Para medir la actividad enzimática, se descongelaron en hielo los extractos celulares y se añadieron 0,010 mg de proteína por reacción. Se siguió el mismo protocolo que el detallado en el apartado 3.16.2. Las muestras se interpolaron en la siguiente recta:

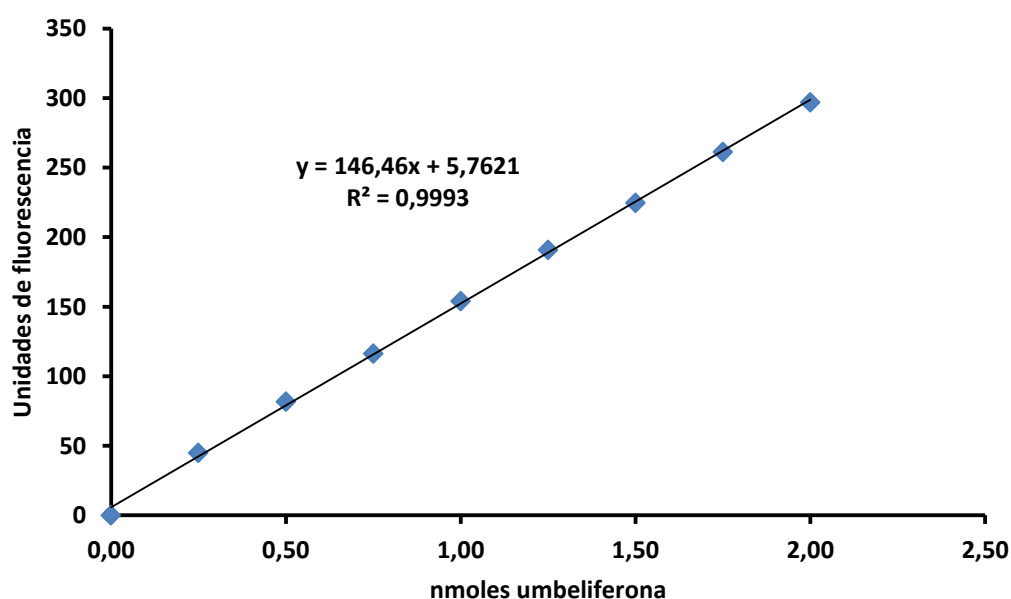


Figura 3.4: Recta de calibrado del sustrato fluorogénico umbeliferona en fibroblastos.

3.23 Análisis estadístico

El análisis estadístico se llevó a cabo con el programa informático IBM SPSS Statistics 20.0 (IBM) tomando como nivel significativo estadístico valores de p menor que 0,05. Los datos fueron analizados mediante el análisis de Kolmogorov-

Smirnov, t-test, U-Mann-Whitney, ANOVA, Kruskal-Wallis y las correlaciones mediante la correlación de Pearson y Spearman.

RESULTADOS

4. Resultados

4.1 Descripción de las manifestaciones clínicas de los pacientes

4.1.1 Familia 1

El caso índice (F1.1) era una mujer de 43 años (figura 4.2). Sus manifestaciones clínicas aparecieron desde la treintena con episodios transitorios pero reiterados de dolor abdominal, diarrea alternando con estreñimiento y dolor precordial acompañado de agotamiento físico y malestar general, fue hospitalizada en varias ocasiones por cuadro de dolor abdominal agudo y diagnosticada de antritis gástrica erosiva. A los 41 años fue diagnosticada de infarto de miocardio anteroseptal, sin compromiso hemodinámico, y requirió la implantación de tres “stents”. En la valoración del episodio trombótico se realizó estudio de hipercoagulabilidad que resultó normal y despistaje de enfermedad de depósito lisosomal que descubrió la presencia de alteraciones genéticas compatibles con enfermedad de Fabry. Se le realizaron exámenes completos hematológicos, neurológicos, oftalmológicos y evaluación de la función renal siendo esta última normal. Se le estudió la conducción de fibra fina mediante la prueba sensorial cuantitativa (QST) de acuerdo con los procedimientos clínicos habituales (Rolke, et al., 2006), en la que se apreciaron anomalías de conducción. En el examen físico se apreció sobrepeso (I.M.C=32,01); ausencia de angioqueratomas, adenomegalias o agrandamiento visceral. Su tensión arterial y frecuencia cardíaca eran normales. Es la sexta de nueve hermanos (6 varones y 3 mujeres) y el estudio familiar practicado reveló:

El hermano mayor de 53 (F1.3) años estaba en estudio por presentar una gammapatía monoclonal de significado incierto (GMSI IgG-Kappa), se excluyó mieloma múltiple. Refería desde la adolescencia cansancio fácil y sensación de falta de aire. A los 40 años, fue intervenido para realizar fijación vertebral debido a espondilolistesis que le originaba dolor dorsal e impotencia funcional. Presentaba acroparestesias, intolerancia al calor e hipohidrosis desde la niñez. También dificultades para respirar e intolerancia a la actividad física. Los estudios de función renal, cardíaca y pulmonar resultaron normales. En el examen físico no se apreciaron hemangioqueratomas. Los estudios de conducción demostraron sensibilidad dolorosa y térmica disminuida en guante y en calcetín. La detección del umbral de sensación

de frío fue elevada sugiriendo una alteración del nervio sensorial A-delta, así como la del umbral del calor por afectación de las fibras C.

El segundo hermano (F1.10) de 49 años mostró presencia de engrosamiento miocárdico y signos leves de insuficiencia cardiaca.

El cuarto hermano había fallecido en accidente de tráfico antes de cumplir 30 años.

El quinto de los hermanos de 41 años (F1.4) mostraba pérdida auditiva y acroparestesias leves, así como cuadros depresivos. A los 41 se descubrió deterioro moderado de la función renal caracterizado por microalbuminúria. En la biopsia renal practicada se apreciaron depósitos de material glucolipídico en los túbulos renales y glomérulos así como vacuolizaciones e inclusiones de Gb₃ en podocitos en el estudio ultramicroscópico (figura 4.1).

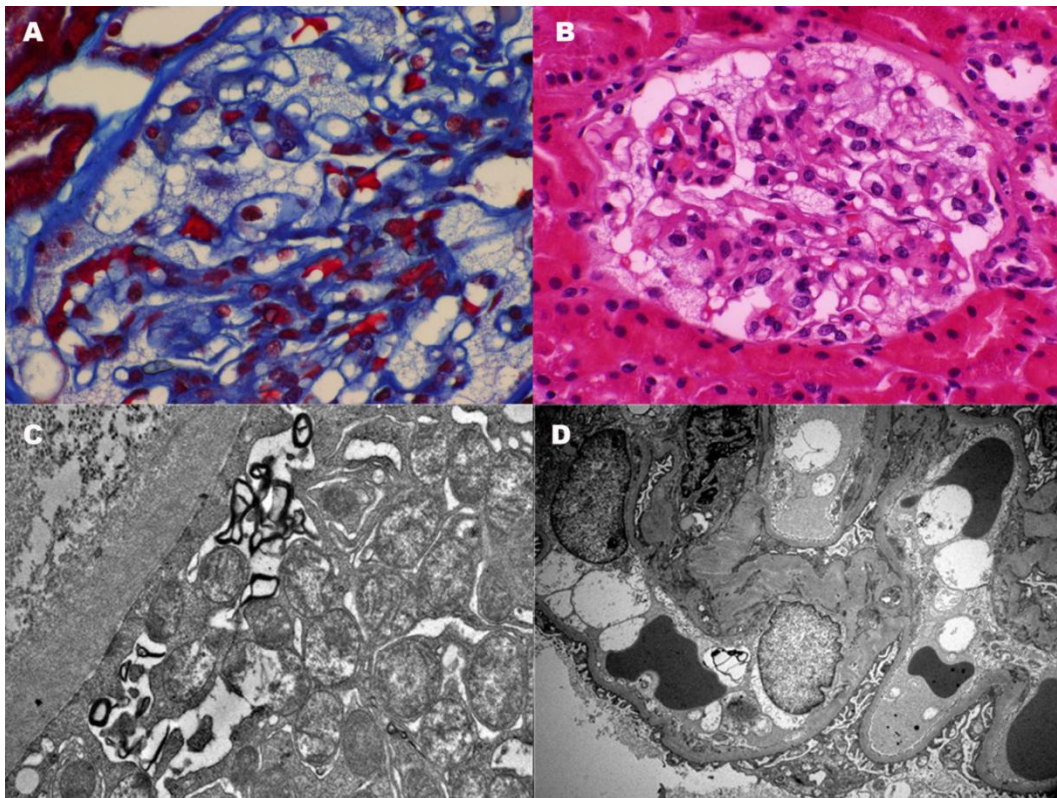


Figura 4.1: Vacuolización citoplasmática observada en un podocito del paciente F1.4, mediante microscopia óptica con (A) Tricrómico modificado, (B) Tinción con hematoxilina-eosina, (C) Inclusiones de Gb₃ en un podocito con apariencia de ultraestructura laminar concéntrica (Microscopia electrónica), (D) Áreas focales de la pérdida difusade los podocitos. Son visibles los depósitos amorfos de Gb₃ en las células epiteliales parietales del glomérulo y en el endotelio (Microscopia electrónica).

La hija del paciente F1.4 de 7 años (F1.6) presentó microalbuminuria.

RESULTADOS

El sexto de los hermanos varones de 39 años (F1.2), refería acroparestesias, pérdida de función auditiva bilateral, intolerancia al calor, e hipohidrosis. Las funciones renal y cardíaca fueron normales. De las dos hermanas la mayor de 50 años (F1.12) no presentó ningún síntoma ni signo relevante y la más joven de 37 años (F1.7) refería historia de taquiarritmias y desde la infancia acroparestesias, hipohidrosis e intolerancia al calor. El estudio de la función renal de F1.7 reveló presencia de microalbuminuria.

Los padres (F1.8 y F1.11) de 75 y 76 años no presentaban manifestaciones clínicas asociadas a la EF.

4.1.2 Familia 2

El caso índice de la familia 2 fue una mujer de 49 años (F2.2) (figura 4.3). Había sido diagnosticada de un síndrome de Wolff-Parkinson-White a los 20 años. Desde la adolescencia refería intolerancia al frío y al ejercicio, cansancio intenso y olvidos simples, siendo incapaz de recordar números. Sufría de hipotensión, hipohidrosis, artralgias, pérdida auditiva, acroparestesias moderadas, reacciones asmáticas a varios alérgenos y una úlcera gástrica recurrente secundaria a infección por *Helicobacter Pylori*. A los 40 años se le detectó microalbuminúria, el estudio de función renal demostró disfunción renal moderada con índice de filtración glomerular de 88,94 ml/min y proteinuria alrededor de 0,10 g/L en 24 horas. La biopsia renal mostró esclerosis glomerular focal y segmental, con microvacuolaciones en los podocitos por depósito glucolipídico y características inclusiones lisosomales. La microscopía electrónica demostró inclusiones con ultraestructura laminar concéntrica características de la EF. El estudio de las fibras finas mediante QST mostró una alteración en la fibra nerviosa sensorial A-Delta. En el estudio de funcionalismo cardíaco se detectaron además de las alteraciones de conducción la presencia de hipertrofia ventricular por depósito en miocardio.

Como antecedentes familiares refería el diagnóstico de enfermedad de Fabry en un primo hermano (F2.4) de 50 años con grave insuficiencia renal crónica que requirió injerto renal a los 40 años.

El caso índice (F2.2), tiene una hermana (F2.1) de 37 años asintomática. La madre de 79 (F2.3) años presentó clínica de degeneración articular, requiriendo prótesis de rodilla y varios episodios de epigastralgia aguda.

4.2 Análisis genético

La secuencia del gen *GLA*; promotor, los 7 exones y nexos exón/intrón; por el procedimiento descrito en la sección 3.9, del caso índice de la familia 1 (F1.1), mostró la presencia de un haplotipo complejo intrónico (HCI) en heterocigosis, formado por los polimorfismos representados en la tabla 4.1.

Tabla 4.1: Haplotipo Complejo Intrónico (HCI).

POSICIÓN	POLIMORFISMO (SNP)	CAMBIO DE NUCLEÓTIDO	REFERENCIA SNP (RS#)
5'-UTR	IVSO-10C>T	C.-10C>T	2071225
INTRÓN 2	IVS2-76_80DEL5	C.370-77_81 DEL5 CAGCC	5903184
INTRÓN 4	ISV4-16A>G	C.640-16A>G	2071397
INTRÓN 6	IVS6-22C>T	C.1000-22C>T	2071228

El estudio familiar, reveló que los sujetos F1.2, F1.3, F1.4 y F1.10, eran hemizigotos para el HCI; mientras que los sujetos F1.5, F1.6, F1.7, F1.8 y F1.9 eran heterocigotos para la herencia del HCI. (Figura 4.2).

RESULTADOS

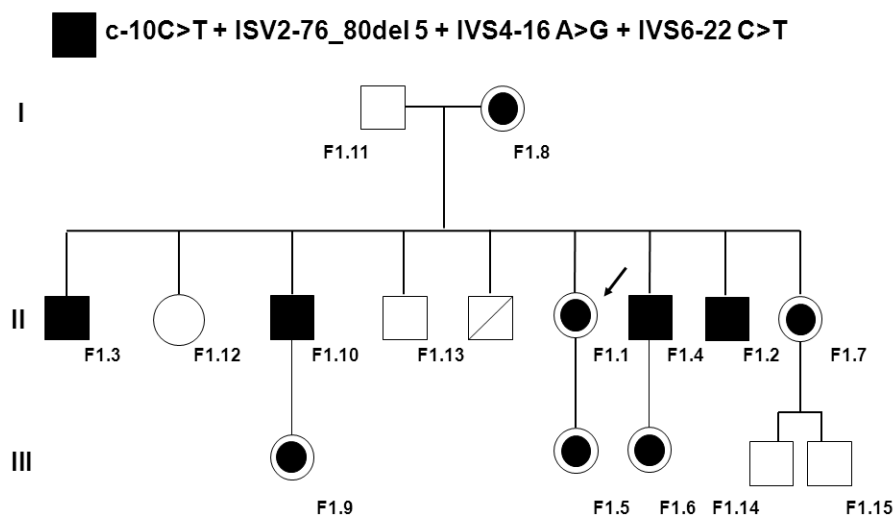


Figura 4.2: Pedigrí familia 1. Portadores del HCL.

En el caso índice de la familia 2 (F2.2), se identificó la herencia en heterocigosis de una mutación puntual en el exón 4 representada en la tabla 4.2.

Tabla 4.2: Mutación puntual de cambio de aminoácido en la familia 2.

Posición	Mutación	Cambio de nucleótido	Cambio Aminoácido	Código HGMD
Exón 4	G183V	c.548 G>T	Glicina por Valina	CS941494

Esta mutación produce la substitución del aminoácido glicina por valina en la posición 183 de la secuencia proteica (p.G183V). Esta mutación está ubicada en un sitio de ajuste; el triplete de bases que codifica para el aminoácido en la posición 183 está compartido entre el exón 3 y 4. El estudio familiar reveló que los sujetos F2.1, F2.3, F2.5, F2.8 y F2.9 eran heterocigotos mientras que los sujetos F2.4 y F2.6 eran hemocigotos para la mutación. El pedigrí de la familia 2 está representado en la figura 4.3.

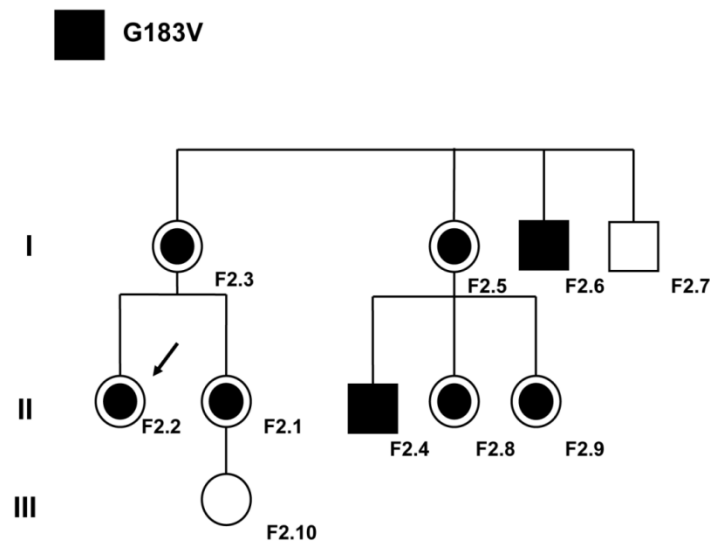


Figura 4.3: Pedigrí familia 2. Portadores de la mutación puntual G183V.

4.3 Análisis enzimático

4.3.1 Análisis enzimático en muestras de plasma y leucocitos

El análisis enzimático se realizó en muestras de leucocitos y plasma a partir de sangre periférica siguiendo los protocolos descritos en el apartado 3.16.1. Para la población control se utilizaron 33 muestras de plasma y 27 de leucocitos de sujetos sanos. Los valores encontrados en plasma y células para la población de controles varones así como mujeres están descritos en la tabla 4.3.

Tabla 4.3: Tabla de valores de la actividad enzimática de la α -galactosidasa A en plasma y en extractos de leucocitos fragmentados por ultrasonidos de controles sanos.

CONTROLES						
Sexo	Valores de actividad en leucocitos (nmol/mg/h)	Desviación estándar	Valores de actividad en plasma (nmol/mL/h)	Desviación estándar	(n) leucocitos	(n) plasma
Varones	49,2	10,3	23,1	14,7	9	12
Mujeres	64,0	33,3	19,8	11,9	15	17
Todos	58,1	26,6	20,8	12,5	27	33

RESULTADOS

Los valores totales de actividad para los sujetos de las dos familias están representados en la tabla 4.4.

El caso índice de la familia (F1.1) mostró valores de actividad enzimática normales con respecto a la población control, sin embargo; dados los signos y síntomas que presentaba fue clasificada como portadora sintomática de EF. Su hija F1.5 fue clasificada como portadora asintomática de EF. Los valores de actividad para F1.3 fueron del 67% y del 65% en plasma y células respectivamente, fue clasificado como paciente sintomático de EF. Para F1.10 se observaron actividades bajas en plasma, del 43% y una actividad en células del 67%, fue clasificado como paciente sintomático. Para F1.4 los valores de actividad fueron del 72% en plasma y del 64% en células. F1.4, fue clasificado como paciente sintomático de EF. La hija de F1.4, (F1.6), mostró una actividad del 43% con respecto a los valores referencia, aunque dado que no presentaba ningún síntoma asociado a EF, fue clasificada como portadora asintomática. Para F1.2, las actividades enzimáticas fueron totalmente normales (91% en plasma y 98% en células) aunque fue clasificado como afecto por EF. En F1.7 se demostró una actividad en plasma del 72% y del 74% en células y fue clasificada como portadora sintomática de EF.

El caso índice de la familia 2 (F2.2) presentó una actividad α -galactosidasa A baja en plasma, del 19%; mientras que en células la actividad era del 49%, fue clasificada como portadora sintomática. La madre (F2.3) y hermana (F2.1) de la paciente fueron clasificadas como portadoras asintomáticas. La actividad más baja se registró para el paciente hemicígote F2.4 en el que la actividad enzimática en células fue del 3% y del 14% en plasma.

Tabla 4.4: Tabla de actividades enzimáticas para los sujetos de la familia 1 y la familia 2.

Muestra	α -gal A leucocitos (nmol/mg/h)	α -gal A plasma (nmol/ml/h)	% Actividad leucocitos	%Actividad Plasma
F1.1	63	23	108	111
F1.2	57	19	98	91
F1.3	38	14	65	67
F1.4	37	15	64	72
F1.7	43	15	74	72
F1.8	51	35	88	168
F1.10	39	9	67	43
F1.5	42	37	72	178
F1.6	no	9	no	43
F2.1	47	19	81	91
F2.2	25	4	43	19
F2.3	49	12	84	58
F2.4	2	3	3	14

4.3.2 Análisis enzimático en cultivos celulares primarios de fibroblastos

El análisis enzimático en muestras de cultivos de fibroblastos se realizó siguiendo los protocolos descritos en el apartado 3.16.2. Se pudo analizar la actividad enzimática de una muestra control y de los sujetos de la familia 1: F1.1, F1.3, F1.4 y de la familia 2: F2.1, F2.3. Se observaron niveles bajos de actividad en los extractos celulares de todas las muestras de forma significativa, excepto para el sujeto F1.3. Los valores de actividad en porcentaje respecto a la muestra control están representados en la figura 4.4.

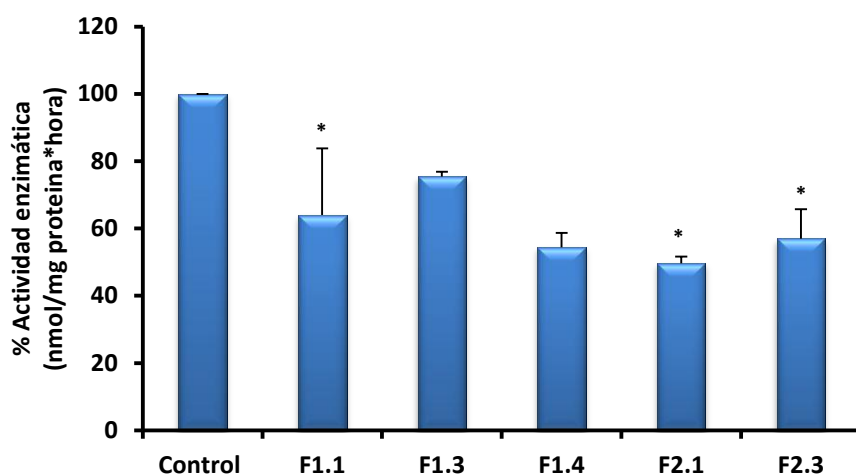


Figura 4.4: Valores de actividad enzimática de los extractos de fibroblastos representados en porcentaje con respecto a la muestra control. Media±EEM. (n=3) * $p < 0,05$.

4.4 Análisis de variantes de ajuste alternativo

4.4.1 Análisis de variantes “*in silico*”

Mediante la herramienta informática Splice Site Prediction Program by Neural Network (SSPNN) (ver enlaces) fueron analizadas las secuencias circundantes a los polimorfismos que forman el HCI y la mutación G183V, ubicada en la junta del exón 4. Fueron observados cambios en los patrones de ajuste del HCI únicamente en las variantes IVS2-76_80del 5 y ISV4-16A>G. La variante IVS2-76_80del 5 destruye un posible sitio aceptor en la posición intrónica ISV2-78 con una puntuación de 0,8 (SSS). La puntuación (SSS) en el intrón 4 para el sitio fisiológico ISV4-1 en la variante ISV4 -16A>G cae de 0,62 a 0,58. Para la mutación p.G183V, un sitio aceptor potencial en el intrón 3 en la posición ISV3-857 incrementa su puntuación (SSS) desde 0,76 a 0,82. Los resultados indican que se podría generar un patrón de ajuste anómalo en la herencia del HCI y la mutación G183V. Los resultados del análisis se encuentran representados en la tabla 4.5.

Tabla 4.5: Resultados del análisis “*in silico*” para las variantes encontradas en las dos familias.

Variante	Cambio de base	Sitio aceptor fisiológico	(SSS) fisiológico	Sitio aceptor Mutado	(SSS) mutado
IVS2-76_80del 5	C.370-77_81 DEL CAGCC	ISV2-78	0,8	Desaparece	-
ISV4-16A>G	C.640-16A>G	ISV4-1	0,62	ISV4-1	0,58
IVS6-22C>T	C.1000-22C>T	ISV6-1	0,97	ISV6-1	0,97
G183V	c.548 G>T	ISV3-857	0,76	ISV3-857	0,82

4.4.2 Identificación mediante clonación de los fragmentos adyacentes a los polimorfismos IVS4-16A>G y IVS6-22C>T del gen *GLA*

Para tratar de caracterizar el posible ajuste alternativo generado por los polimorfismos en zonas cercanas a las juntas de los exones 5 y 7 se amplificaron las regiones que flanquean a estos exones en una muestra control y en una muestra del caso índice de la familia 1, tal y como se describe en el apartado 3.11.2. Estos experimentos se llevaron a cabo en la familia 1 antes del diagnóstico de la familia 2 y no se realizaron con las muestras de sus componentes. Como se explica más adelante, la detección de un ajuste anómalo se analizó mediante el procedimiento descrito en el apartado 3.11.4.

Primeramente se estudió la región que flanquea al exón 5 para ver si el polimorfismo ISV4-16A>G alteraba el ajuste alternativo. Los resultados por PCR convencional no mostraron diferencias entre los fragmentos amplificados en la muestra F1.1 y el control (figura 4.5).

RESULTADOS

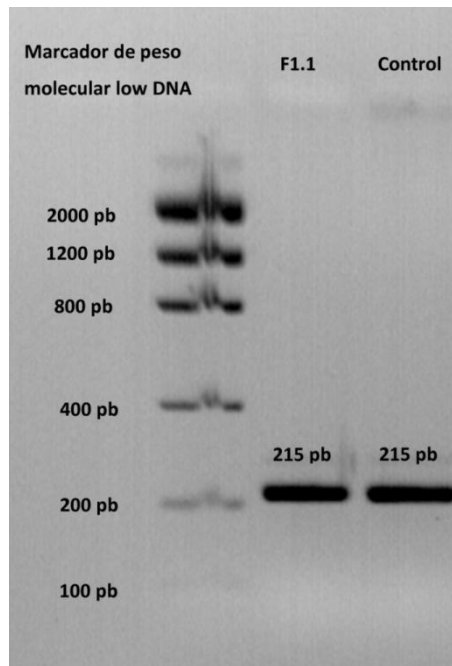


Figura 4.5: Amplificación de las zonas cercanas a los exones 5 y 7 del caso índice y su control por PCR convencional.

Para evitar un posible falso negativo, por una diferencia de tamaño pequeña entre las bandas, se realizó una electroforesis en un gel de poliacrilamida al 6%. En este caso se amplificó por PCR la región que flanquea al exón 5 para ver si el polimorfismo ISV4-16A>G alteraba el ajuste alternativo y la región que flanquea al exón 7 en la que estaba incluido el polimorfismo IVS6-22C>T. Tampoco se observaron diferencias de tamaño en las bandas (figura 4.6).

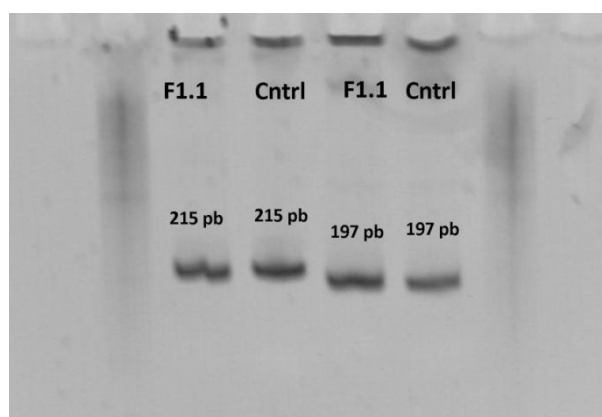


Figura 4.6: Electroforesis en gel de PAA al 6% de las juntas de los exones en una muestra del caso índice y su control (ISV4-16A>G (215pb); IVS6-22C>T (197pb)).

Conforme se obtuvieron más muestras de la familia 1 (F1.2, F1.3, F1.4) se amplificaron las mismas regiones por PCR y se clonaron los productos mediante el vector p-GemT (ver apartado 3.11.2) para obtener una única molécula de los posibles fragmentos del RNA mensajero y poder caracterizar los posibles ajustes alternativos producidos por las variantes. Se amplificó la región del inserto mediante el uso de cebadores universales y se secuenció (ver apartado 3.11.2.7). Tampoco se consiguieron encontrar diferencias entre las secuencia molde en el control y los pacientes.

4.4.3 Caracterización mediante la separación de fragmentos por electroforesis en geles de poliacrilamida al 6%

Mediante la separación de fragmentos por electroforesis en geles de poliacrilamida se intentaron caracterizar las posibles variantes del RNA mensajero producidas por el ajuste alternativo. Para ello se obtuvieron muestras de RNA total de los sujetos de la familia 1: F1.1, F1.2, F1.3, F1.4, F1.5 y F1.6, portadores del HCl; de la familia 2: F2.1, F2.2, F2.3, portadores de la mutación G183V; de un control varón y otro mujer (ver apartado 3.7.1). A partir de las muestras de RNA de los portadores y los controles, por retrotranscripción, obtuvimos muestras de cDNA (ver apartado 3.10) que fueron utilizadas como molde para amplificar toda la molécula de mensajero. Los amplicones de los sujetos de la familia 1, familia 2 y los controles, fueron sometidos a una electroforesis en gel de poliacrilamida al 6% para poder compararlos por tamaño con las muestras control. Como se puede apreciar en la figura 4.7 mediante esta técnica, tampoco fue posible caracterizar ningún fragmento de diferente tamaño al de los controles.

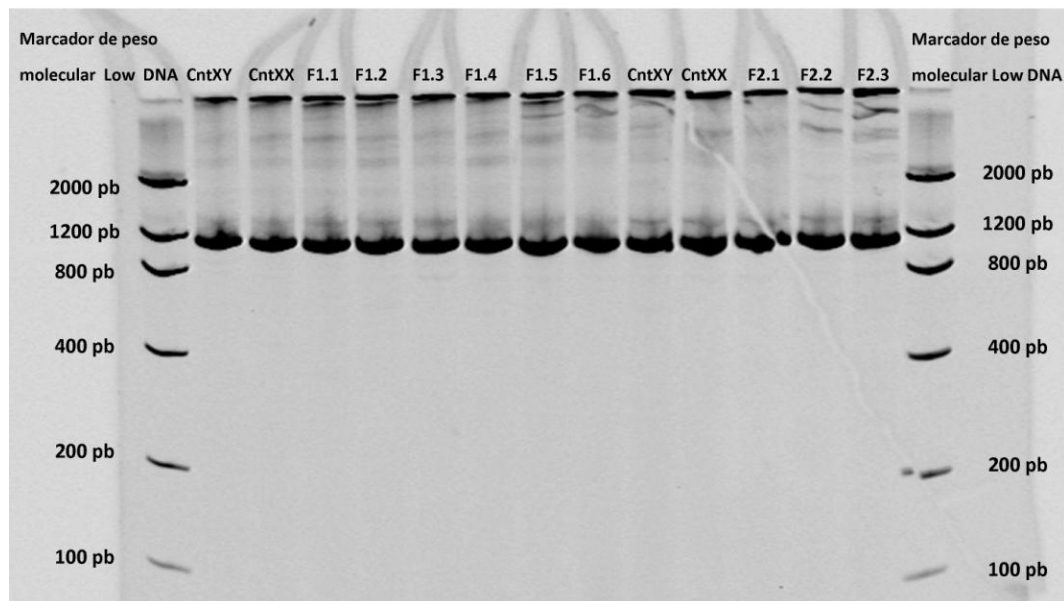


Figura 4.7: Electroforesis en gel de poliacrilamida al 6% de las muestras del cDNA del mensajero completo de *GLA* en la familia 1, familia 2 y sus respectivos controles.

4.4.4 Identificación mediante la secuenciación del cDNA completo del gen *GLA*

Para identificar las posibles variantes de ajuste por secuenciación; a partir del cDNA obtenido para realizar los experimentos del apartado 4.4.3, se diseñó una PCR anidada para obtener fragmentos con un tamaño inferior a las 700 pb, que nos permitiesen analizarlos mediante la secuenciación automática y de tal manera que quedasen solapados para evitar la pérdida de información. No se encontraron diferencias entre la secuencia molde y las secuencias obtenidas de los pacientes, del control varón y del control mujer.

4.4.5 Clonaje de la región 3' del intrón 6 del gen *GLA*

Con objeto de estudiar la posible participación en los mecanismos de regulación génica y una posible alteración del patrón de ajuste, clonamos la región 3' del intrón 6. Para ello utilizamos el conjunto de reactivos miScript PCR System (Qiagen), que nos permite la amplificación de moléculas de RNA pequeñas (ver apartado 3.11.5). Posteriormente purificamos, clonamos y secuenciamos los productos del control y de los pacientes F1.1, F1.3, F1.4. La secuenciación del inserto reveló la presencia de un fragmento formado por 50 pb de la región 3' del intrón 6 y todo el exón 7 (g.100653137-g.100652798) en el paciente F1.4.

4.4.6 Análisis de la expresión génica por PCR cuantitativa (RT-qPCR)

El gen *GLA* tiene 7 transcritos conocidos (ENSG00000102393) de los cuales solo uno codifica para proteína. En el apartado 4.4.5 se describe un fragmento clonado a partir del RNA de portadores de la familia 1 que podría coincidir con dos de los siete transcritos descritos en el gen *GLA*. Para el análisis del perfil de la expresión de *GLA*, se diseñó una sonda TaqMan que nos permitía detectar el posible producto de ajuste clonado en el paso 4.4.5 (*GLA-M*); se utilizó una sonda para detectar *GLA* y otra para *GAPDH* como estándar interno siguiendo el protocolo detallado en el apartado 3.12. A partir de una muestra de cDNA control, realizamos las rectas estándar para calcular la eficiencia de los cebadores (ver apartado 3.12.2). Las rectas para las tres sondas mostraron un coeficiente de determinación $R^2 > 0,99$. Los valores de las eficiencias para las sondas fueron: $E_{GLA}=0,85$, $E_{GLA-M}=0,85$, $E_{GAPDH}=0,97$.

Una vez tuvimos optimizadas las condiciones de reacción se llevó a cabo una qPCR de las muestras por triplicado siguiendo el protocolo detallado en el apartado 3.12 y se calculó la cuantificación relativa (RQ) de la expresión de los dos transcritos a partir de los valores de Ct registrados para cada portador (figura 4.8); comparándolos entre los controles emparejados por sexo.

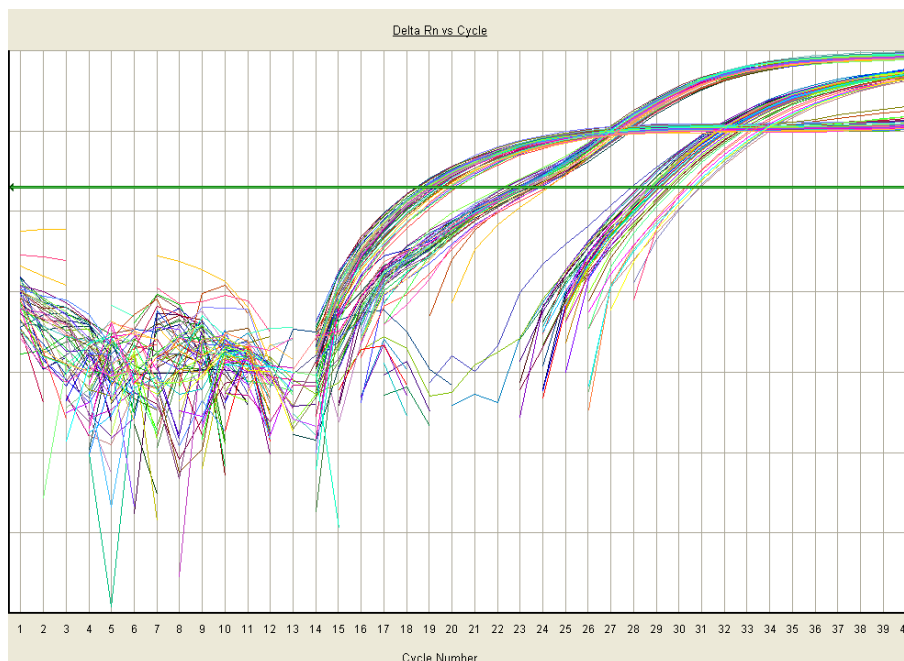


Figura 4.8: Representación de la señal de amplificación para el gen *GAPDH*, los transcritos *GLA* y *GLA-M*.

RESULTADOS

En todos los portadores la expresión relativa del transcrito fisiológico de *GLA* estaba significativamente desregulada a la baja comparado con los dos controles ($p < 0,001$). La expresión relativa de *GLA-M* se encontraba desregulada a la baja en todos los portadores (excepto para F1.4) y se encontraron diferencias significativas ($p < 0,001$) en los casos índice de las dos familias (F1.1 y F2.2) al compararlo con sus controles. La cuantificación relativa del transcrito fisiológico y el clonado (*GLA-M*), está representada en la figura 4.9.

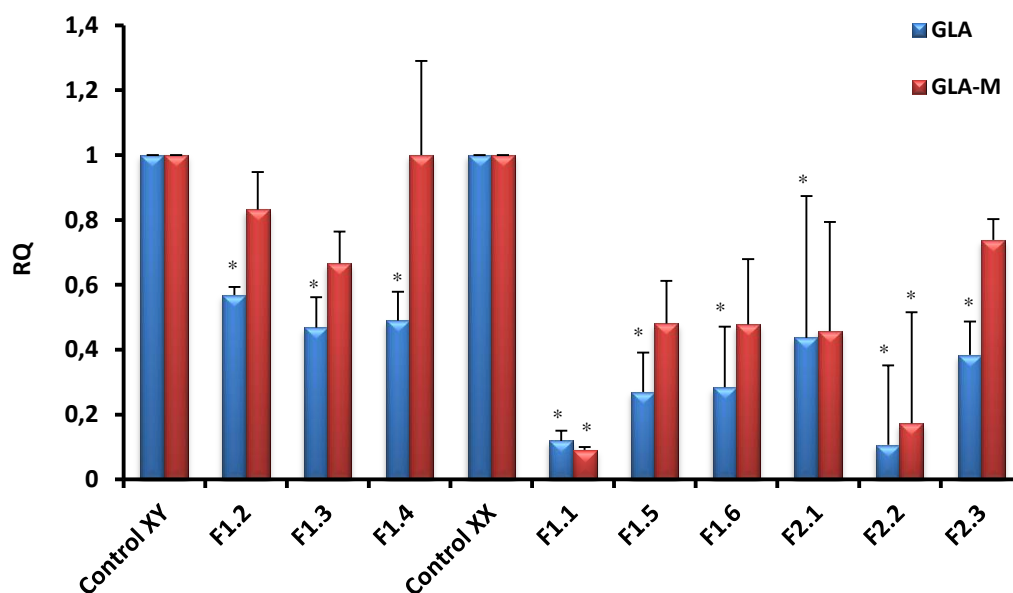


Figura 4.9: Resultados de la cuantificación relativa (RQ) mediante qPCR del transcrito fisiológico de *GLA* y *GLA-M* (fragmento clonado) de los controles, portadores de la familia 1 y la familia 2. Media±EEM.*= $p < 0,001$. Los experimentos se llevaron a cabo por triplicado.

En la comparación de la expresión entre los portadores asintomáticos y los pacientes se observaron valores de expresión por debajo del 50% en *GLA* y *GLA-M* de forma significativa ($p < 0,001$) (figura 4.10).

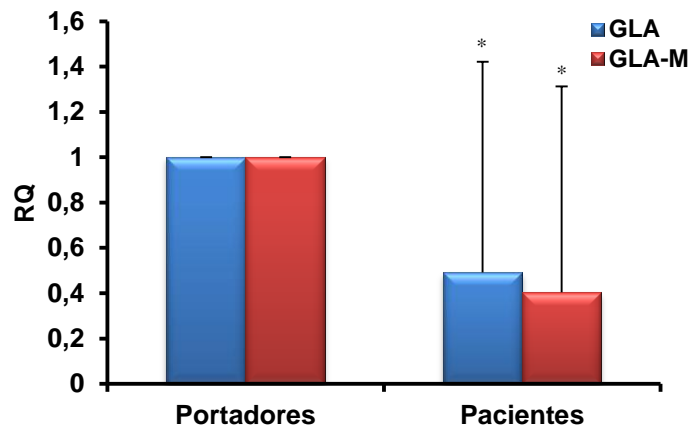


Figura 4.10: Comparación de la cuantificación relativa (RQ) de los transcritos *GLA* y *GLA-M* entre portadores y pacientes. Media±EEM. *= $p < 0,001$.

Al comparar la expresión de los transcritos en relación al género, observamos diferencias significativas en la expresión de *GLA* ($p=0,003$) entre el grupo de los varones frente al control (figura 4.11) en cambio en el grupo de las mujeres no encontramos diferencias significativas.

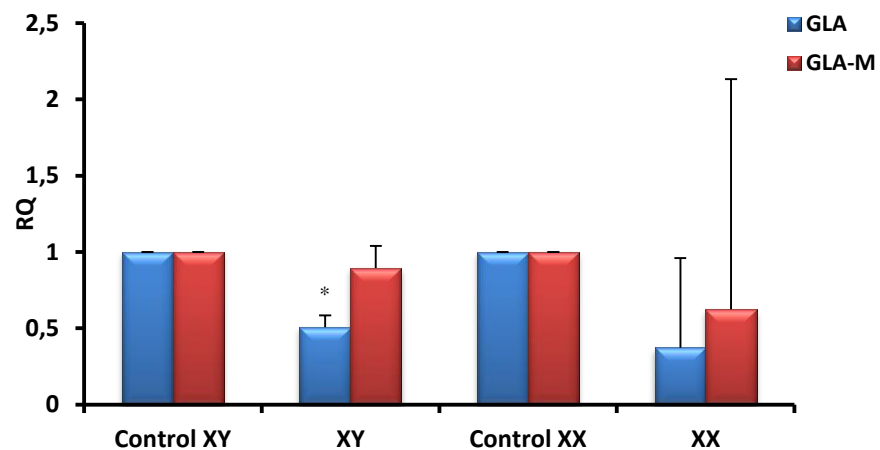


Figura 4.11: Comparación de la expresión relativa (RQ) de *GLA* y *GLA-M* entre varones y mujeres. Media±EEM. *= $p < 0,001$.

RESULTADOS

4.5 Búsqueda de sitios de unión de factores de transcripción a la zona promotora circundante a la variante IVSO-10C>T

4.5.1 Análisis “*in silico*”

Con objeto de identificar posibles secuencias consenso para la unión de factores de transcripción en la zona promotora circundante a la variante ISVO-10C>T, llevamos a cabo un análisis mediante el software MatInspector (Genomatix), según lo descrito en el apartado 3.13.1. Este análisis reveló la existencia de tres lugares potenciales de unión a factores de transcripción que desaparecían cuando la región promotora contenía la variante T. Los factores de transcripción y el sitio de unión están detallados en la tabla 4.6.

Tabla 4.6: Factores de transcripción que potencialmente se unen a la secuencia consenso circundante al polimorfismo ISV0-10C>T.

Familia	Descripción	Secuencia consenso	Posición
X-BBF	X-box binding factors	tatgctgtccgGTCAccgt	-10
DMRT	DM domain-containing transcription factors	ctgcattGTCACggtgaccgg	-10
SNAP-C	snRNA-activating protein complex	gTCACcgtgacaatgcagc	-10

4.5.1 Estudios en gel de retardo. Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

Se analizó mediante esta técnica, si la variante alélica ISV0-10C>T podía influir en la interacción entre el DNA y las proteínas nucleares. Los experimentos se llevaron a cabo en el laboratorio del profesor José Carlos Rodríguez Rey en el departamento de Biología molecular de la Universidad de Cantabria, siguiendo el protocolo descrito en el apartado 3.13.2. Los resultados mostraron diferencias apreciables respecto a la afinidad de las proteínas nucleares entre los dos alelos. El alelo C mostró una mayor afinidad con las proteínas nucleares que el alelo T (figura 4.12: A). Para confirmar esta diferencia, en los EMSA, se realizó un experimento de competición, utilizando cantidades del oligonucleótido no marcado crecientes (figura 4.12: B). Nuestros resultados mostraron que el alelo T se desplazaba mucho más fácilmente del

complejo proteína-DNA (figura 4.12: B). Esto quiere decir que el cambio C>T resultó en una capacidad mermada para la unión proteína- DNA.

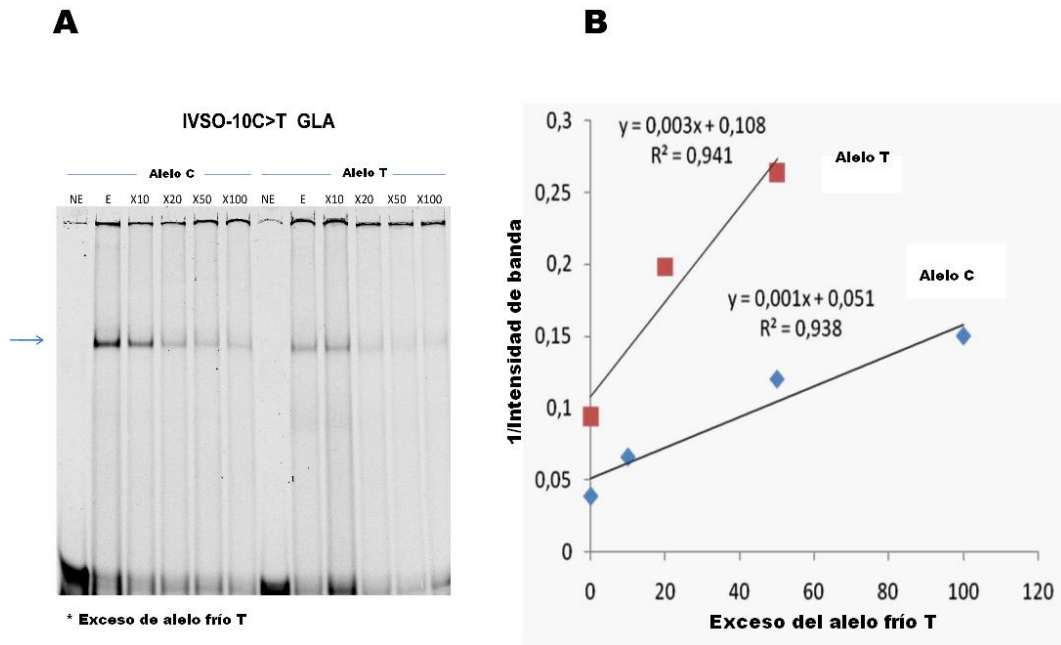


Figura 4.12: A) EMSA llevado a cabo con las sondas que contenían los alelos C y T de la variante ISV0-10C>T en el promotor de *GLA*. (B) La representación inversa de las intensidades de banda en el EMSA representadas frente el exceso de el oligonucleótido del alelo T frío. Muestra que el alelo T (pendiente=0,003) es más fácilmente desplazable del complejo proteico que el alelo C (pendiente= 0,001).

4.6 Análisis de metilación

4.6.1 Estudio de la metilación de islas CpG de la región promotora de *GLA* (-68_+140)

Mediante el uso del programa informático Methprimer se analizó la región promotora circundante a la variante ISV0-10C>T, -68_+140. En esa región el programa informático predijo una isla de metilación CpG y 4 posiciones de metilación adyacentes a la posición -10 en las posiciones -32, -30-, -13 y -6. A continuación diseñamos cebadores específicos con objeto de amplificar esta región del promotor (-68_+140) tomando como molde DNA de los individuos portadores de esta variante y los controles, tratado con bisulfito sódico (Ver apartados, 3.14.2 y 3.14.2.1). El porcentaje de metilación en cada posición se cuantificó por triplicado en

RESULTADOS

cada muestra y los experimentos se realizaron por triplicado. Utilizando la técnica de pirosecuenciación, descrita en el apartado 3.14.2.2. Obtuvimos los pirogramas para cada muestra en los que solo se observó metilación en la isla CpG para las mujeres. En las muestras de los varones se observó una metilación residual de las posiciones en la región promotora (figura 4.13).

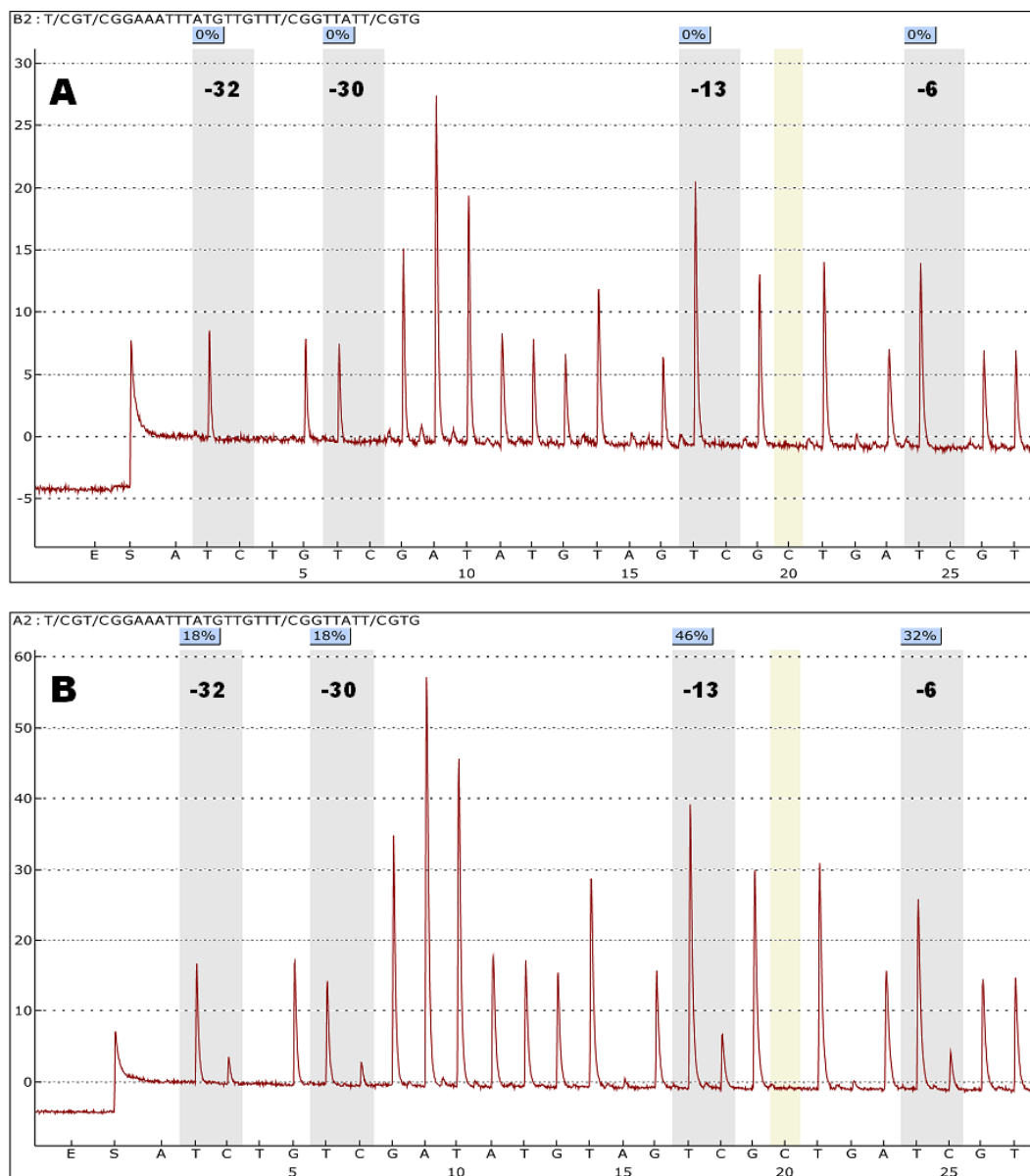


Figura 4.13: Pirogramas de las posiciones de metilación de la zona promotora del gen *GLA*: Las posiciones de metilación se muestran en sombreado. A) Pirograma de un individuo hemicigoto para el alelo -10T. No se aprecia apenas metilación ya que el cromosoma X está totalmente activo. B) Pirograma de una mujer heterocigota -10C/T. Se puede observar metilación en las distintas posiciones debido a la inactivación aleatoria del cromosoma X.

Los resultados de metilación fueron analizados mediante el programa Pyro Q-CpG (Biotage) para obtener los porcentajes de metilación de cada posición y se compararon estadísticamente con el programa IBM SPSS 20.0. La cuantificación de las diferentes posiciones, mostraron perfiles de metilación diferentes para cada muestra.

Tal como cabía esperar, la metilación en las posiciones fue significativamente más alta en las mujeres que en los varones ($p=0,001$) (figura 4.14). En el perfil del porcentaje de metilación, se observa un porcentaje mayor en la posición -13 mientras que el porcentaje menor se observa en la posición -32.

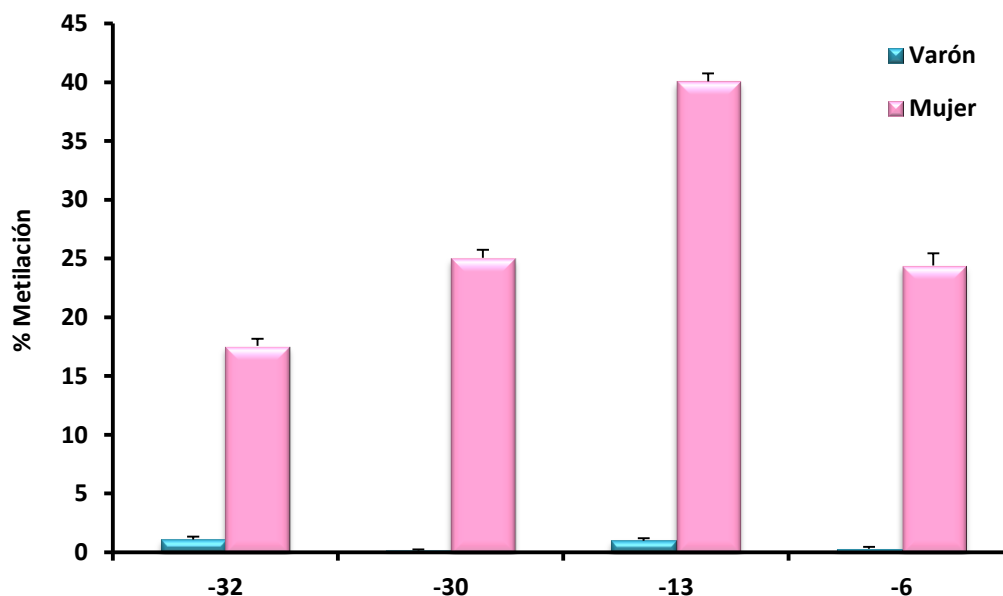


Figura 4.14: Perfil de metilación entre varones y mujeres. En todas las posiciones se observaron diferencias significativas ($p \leq 0,05$). Media \pm EEM.

Se encontraron distintos perfiles de metilación entre mujeres no portadoras de las variantes frente a las portadoras y las que mostraban síntomas de EF (figura 4.15). El grupo de las portadoras mostro una metilación significativamente mayor que el grupo control en la posición -30 ($p < 0,001$) y significativamente menor en la posición -6 ($p = 0,018$). El grupo de enfermas mostró una metilación significativamente menor que el grupo control en la posición -32 ($p = 0,019$) y significativamente mayor en la posición -30 ($p = 0,014$). No se encontraron diferencias significativas en la posición -13.

RESULTADOS

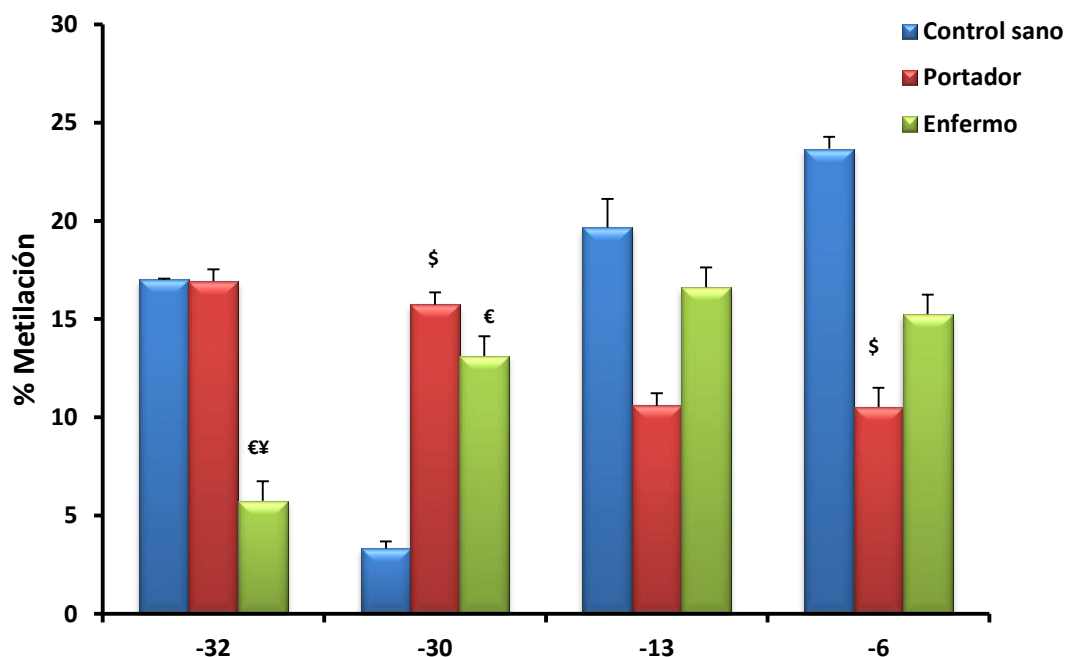


Figura 4.15: Perfil de metilación entre el grupo control sano y el grupo de portadoras y enfermas. Media±EEM. \$= $p \leq 0,05$ controles frente portadoras., €= $p \leq 0,05$ controles frente enfermas, ¥= $p \leq 0,05$ portadores frente a enfermos.

En la comparación del grupo control frente a los portadores del HCI y la mutación G183V también se encontraron perfiles de metilación diferentes. El grupo portador del HCI mostró una metilación significativamente más alta en la posición -30 ($p=0,003$). El grupo portador de la mutación G183V mostro una metilación significativamente más alta que el grupo control en la posición -30 ($p=0,003$) y una metilación significativamente más baja en la posición -6 ($p=0,018$). Encontramos un perfil de metilación diferente entre los portadores del HCI y la mutación G183V. Los portadores del HCI tenían la posición -32 significativamente menos metilada que el grupo portador de G183V ($p=0,004$). No se observaron diferencias en la posición -13. (figura 4.16)

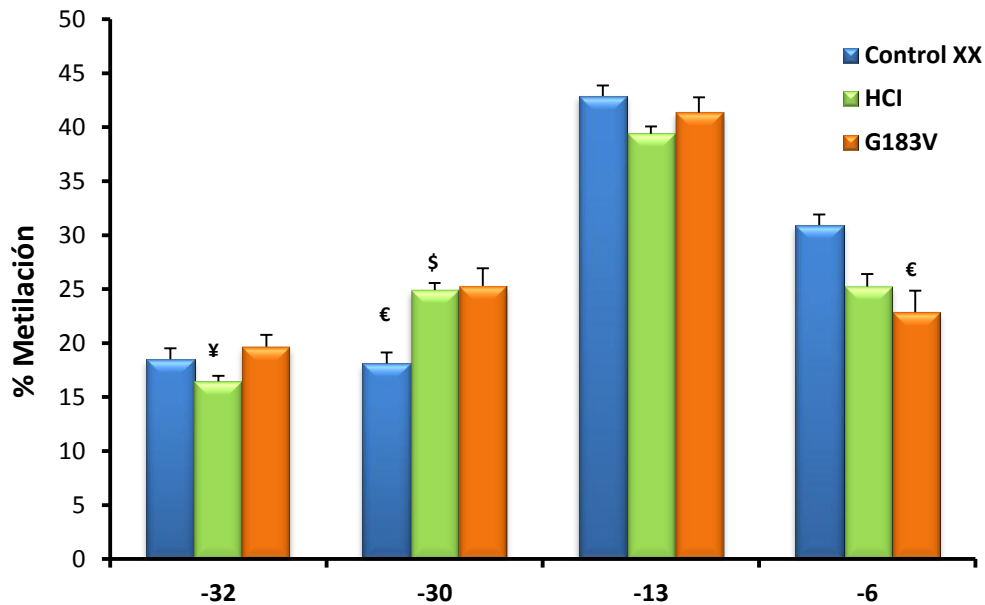


Figura 4.16: Perfil de metilación entre el grupo control sano y el grupo de portadoras del HCl y portadoras de la mutación G183V. Media±EEM \$= $p \leq 0,05$ control frente portadoras del HCl, €= $p \leq 0,05$ control frente portadoras de la mutación G183V, ¥= $p \leq 0,05$ portadoras del HCl frente las portadoras de la mutación G183V.

En el caso de los varones aunque no de forma significativa, se observó una metilación residual muy pequeña. Aunque en comparación con la metilación en mujeres parece un resultado irrelevante, se ha observado un perfil diferente entre los varones afectados por la herencia del HCl y los portadores del G183V. En este perfil se observa una metilación mayor de la posición -32 con respecto al control en los dos grupos (figura 4.17). También se observó un perfil de metilación diferente entre el grupo de varones sanos y el de enfermos (figura 4.18) apareciendo una metilación mayor en la posición -32.

No se observaron correlaciones entre los estados de metilación de las islas y la edad de los sujetos.

RESULTADOS

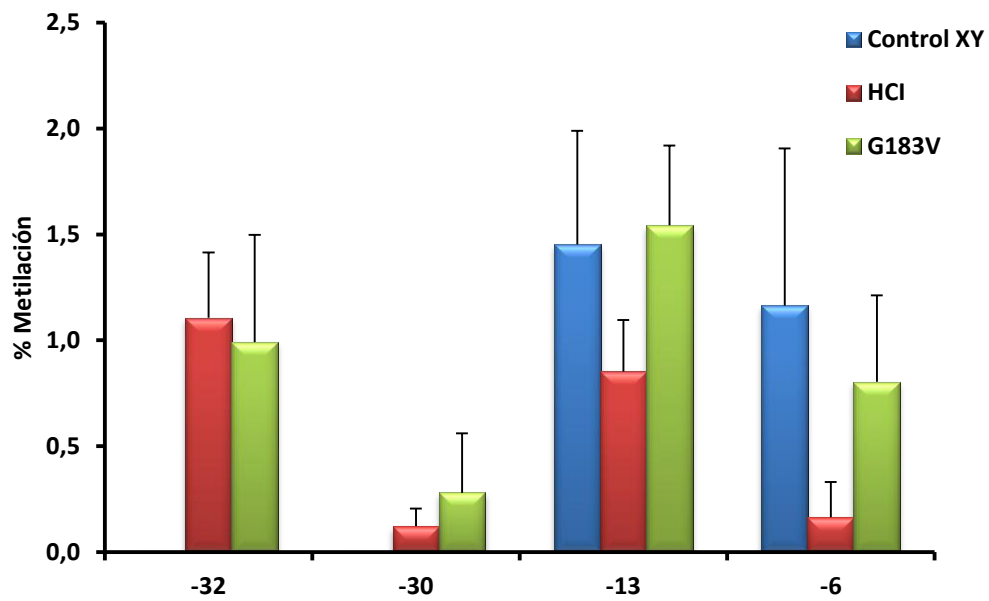


Figura 4.17: Perfil de metilación entre el grupo control y el grupo de hemicigotos para el HCl y la mutación G183V. Media±EEM.

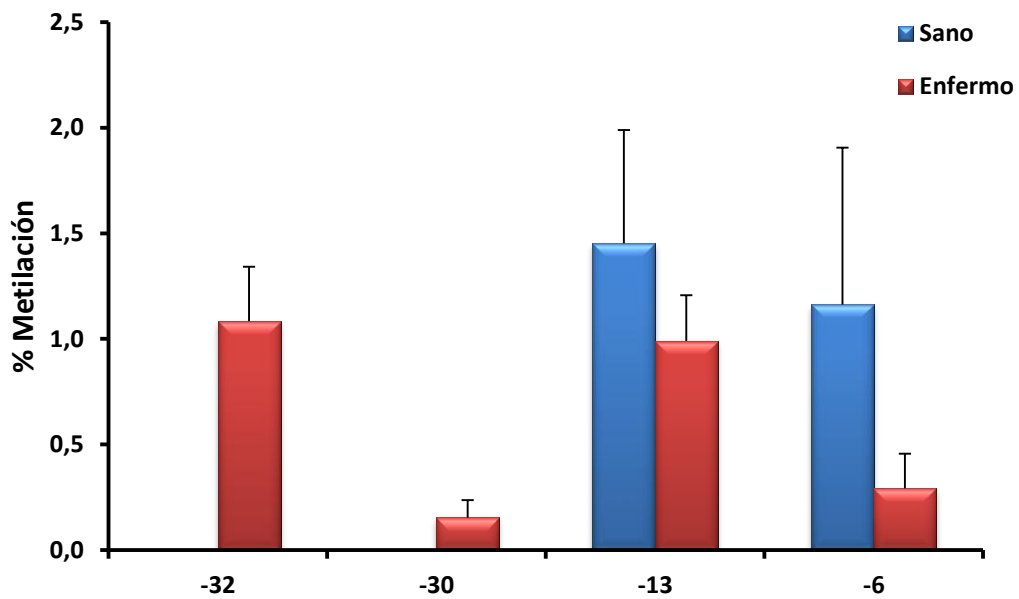


Figura 4.18: Perfil de metilación entre el grupo control sano y el grupo de varones enfermos. Media±EEM.

4.6.2 Determinación de la inactivación del cromosoma X mediante electroforesis capilar metil-específica

Para determinar la inactivación del cromosoma X en muestras de DNA extraído de sangre periférica se genotiparon los diferentes alelos del cromosoma X mediante la detección del marcador STR (Short Tandem Repeat) en el gen HUMARA por PCR fluorescente, específica para DNA tratado con bisulfito, en combinación con la electroforesis capilar. Se cuantificó la metilación (ver apartado 4.6.2). Como controles utilizamos un DNA 100% metilado (el cual no debía amplificar) y otro 0% metilado (figura 4.19)

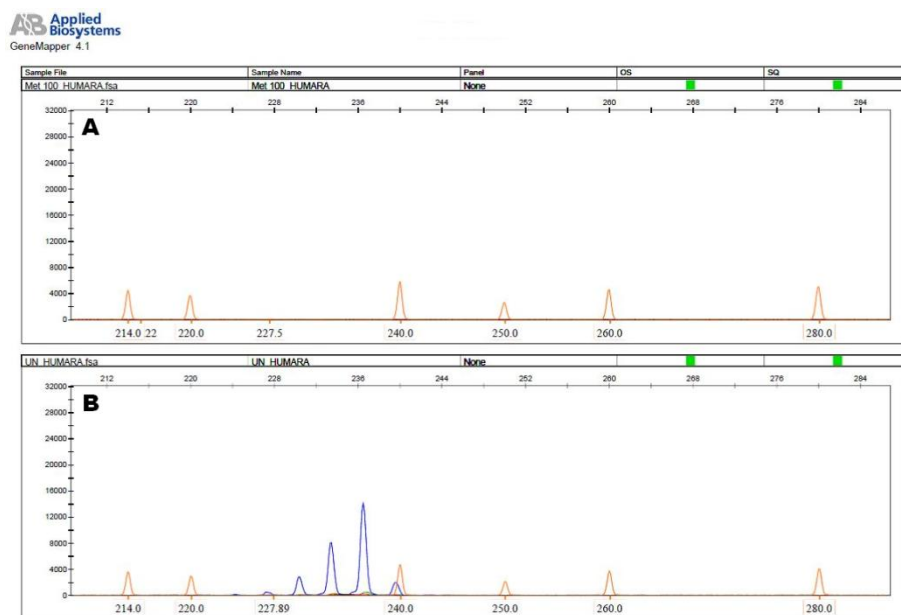


Figura 4.19: Patrón de metilación para los controles. A) DNA 100% metilado. Solo se observa el patrón del marcador de pesos moleculares LIZ-600. B) Se observa el genotipo del control 0% metilado y el patrón del marcador de pesos moleculares LIZ-600.

Se genotiparon las muestras de la familia 1 (figura 4.20) y 2 (figura 4.21) y se cuantificó la metilación (área del pico del genotipo de HUMARA).

RESULTADOS

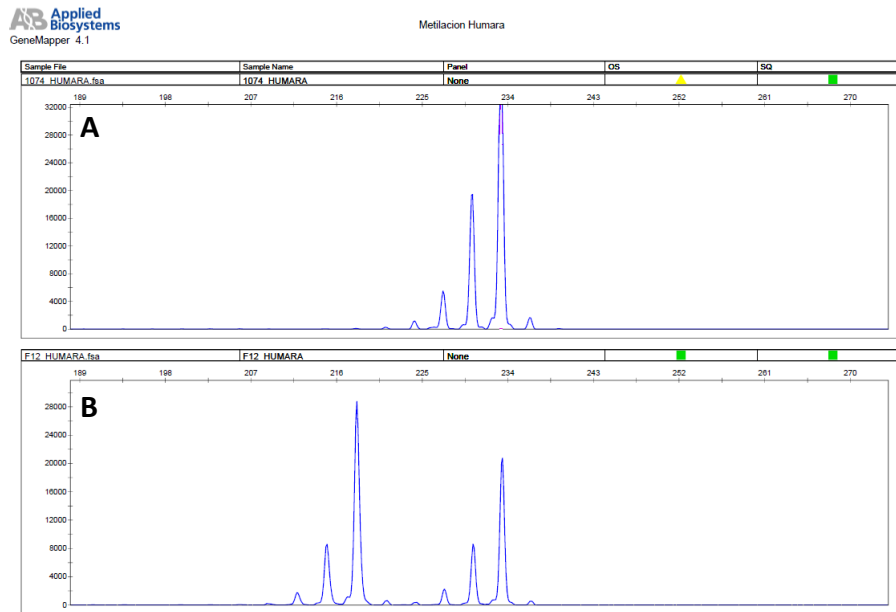


Figura 4.20: Patrón de metilación y genotipado (tamaño del fragmento del AR) de la familia 1. A) Genotipo de un varón hemicigoto para el marcador HUMARA de la familia 1 (fragmentos de 233 pb). B) Genotipo de una mujer heterocigota para el marcador HUMARA de la familia 1 (fragmentos de 221 y 233 pb).

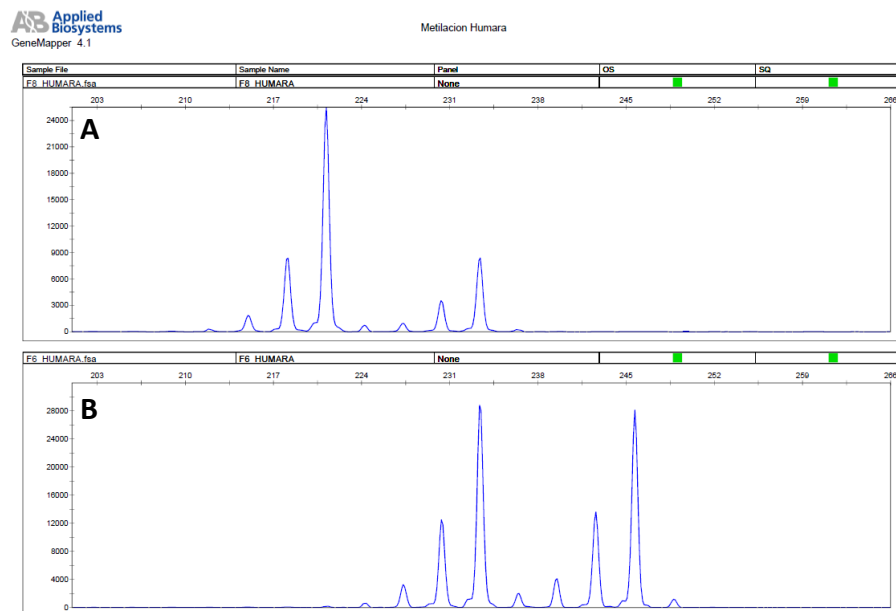


Figura 4.21: Patrón de metilación y genotipado (tamaño del fragmento del AR) de la familia 2. A) Genotipo de la madre heterocigota para el marcador HUMARA de la familia 2.(fragmentos de 227 y 233 pb) B) Genotipo del caso índice de la familia 2, heterocigota para el marcador Humara (fragmentos de 233 y 245 pb).

Los picos que aparecen alrededor del pico principal son artefactos relacionados con la técnica. La polimerasa añade al final de cada producto varias adeninas adicionales que complican la complejidad del patrón.

Una vez genotipadas las muestras, se cuantificó el área del pico correspondiente al genotipo y se calculó el área relativa al otro alelo para obtener los porcentajes de activación del alelo portador de la mutación en el cromosoma X. Los valores se encuentran representados en la tabla 4.7.

Tabla 4.7: Valores de las diferentes áreas alélicas. AAM= Área alelo mutado en unidades arbitrarias, AAS= Área alelo sano en unidades arbitrarias, % de activación y genotipo del receptor de andrógenos (AM=alelo mutado, AS=alelo sano).

Muestra	AAM (UA)	AAS (UA)	% Activación X mutado	Genotipo (pb AR) (AM)	Genotipo (pb AR) (AS)
F1.1	44589	132727	25	233	221
F1.4	1983336	-	100	233	-
F1.5	104480	152874	41	233	218
F1.6	205875	179304	53	233	221
F1.7	7497	17189	32	233	221
F1.8	92967	179169	34	233	239
F2.1	41827	48395	47	227	245
F2.2	148590	135704	53	227	245
F2.3	170311	76958	64	227	233

En las figuras 4.22 y 4.23 se representan los porcentajes de activación del cromosoma X portador de la mutación para los individuos estudiados de la familia 1 y la familia 2 y el tamaño (pb) del fragmento heredado de los alelos del receptor de andrógenos.

RESULTADOS

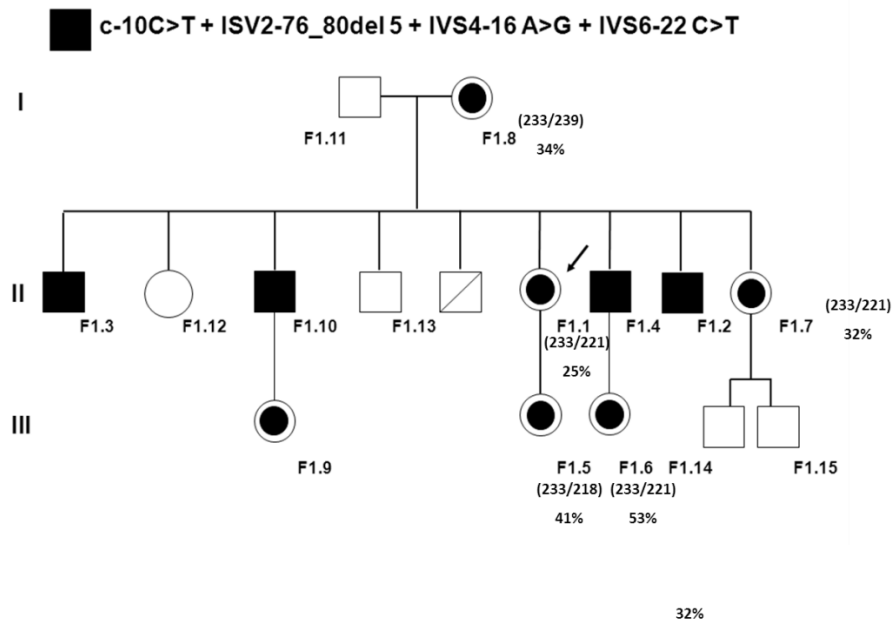


Figura 4.22: Porcentaje de activación del cromosoma X portador del HCl en la familia 1. Entre paréntesis el número de pares de bases de cada alelo del fragmento heredado de HUMARA.

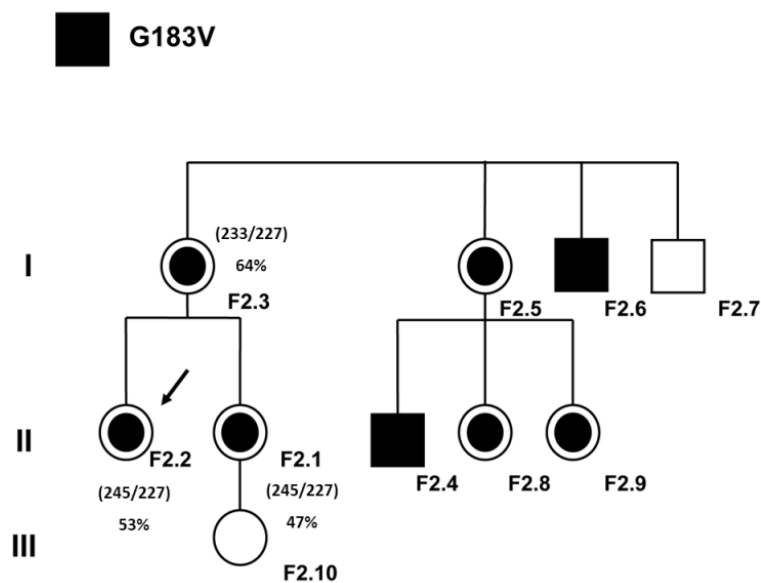


Figura 4.23: Porcentaje de activación del cromosoma X portador de la mutación G183V en la familia 2. Entre paréntesis el número de pares de bases de cada alelo del fragmento heredado de HUMARA.

Mediante el programa informático IBM SPSS 20.0, utilizando la prueba de Pearson y Spearman, analizamos la relación entre el porcentaje de inactivación del cromosoma

X mutado y las actividades enzimáticas de las mujeres portadoras en muestras de plasma y células.

No se encontraron correlaciones significativas entre el perfil de activación del cromosoma X y las actividades enzimáticas.

4.7 Medida de citoquinas proinflamatorias en plasma.

Uno de los grandes problemas en el diagnóstico y seguimiento en EF es la falta de buenos biomarcadores. En otras enfermedades lisosomales se han correlacionado niveles elevados de citoquinas proinflamatorias. Con el fin de estudiar los perfiles y la posibilidad de encontrar nuevos biomarcadores de la enfermedad, analizamos las concentraciones de 8 citoquinas en muestras de plasma, (IL4, IL6, IL7, IL10, IL13, MIP1 α , MIP1 β y TNF α) (siguiendo el protocolo del apartado 3.17) en un grupo control de 9 sujetos y en un grupo de 9 portadores de variantes de EF (3 portadores de la mutación G183V y 6 portadores del HCI) emparejados por edad y sexo. Los valores medios de las concentraciones plasmáticas están representados en la tabla 4.8.

Tabla 4.8: Valores medios de las concentraciones plasmáticas de citoquinas (pg/ml).

Citoquinas	Control		Portadores		Controles		Portadores		
	Controles	Portadores	G183V	HCI	Varones	Mujeres	Varones	Mujeres	
IL4	<1,22	<1,22	<1,22	<1,22	<1,22	<1,22	<1,22	<1,22	<1,22
IL6	2,05	2,50	2,05	2,59	2,45	1,96	1,73	3,44	2,03
IL7	13,85	12,76	13,85	11,17	13,56	13,90	12,44	15,02	11,64
IL10	<1,22	<1,22	<1,22	<1,22	<1,22	<1,22	<1,22	<1,22	<1,22
IL13	<1,22	<1,22	<1,22	<1,22	<1,22	<1,22	<1,22	<1,22	<1,22
MIP1α	6,73	10,46	6,73	5,79	12,80	3,91	4,05	13,80	8,79
MIP1β	5,26	12,96	5,26	2,12	18,39	7,32	4,83	30,45	4,22
TNFα	1,62	1,42	1,62	1,89	1,18	1,62	1,65	1,20	1,53

RESULTADOS

Los datos fueron analizados por los estadísticos de Kolmogorov-Smirnov y la comparación de medias mediante el estadístico t y el método ANOVA utilizando el programa informático IBM SPSS 20.0. No se detectaron las citoquinas IL4, IL10, IL13 en ninguna de las muestras ya que la señal estaba por debajo del límite de detección.

Los portadores de la mutación G183V mostraron valores elevados del TNF α ($p=0,035$) de forma significativa con respecto a los portadores del HCl. Los portadores del HCl mostraron valores significativamente elevados para la citoquina MIP1 α ($p=0,008$) frente a los controles (figura 4.24)

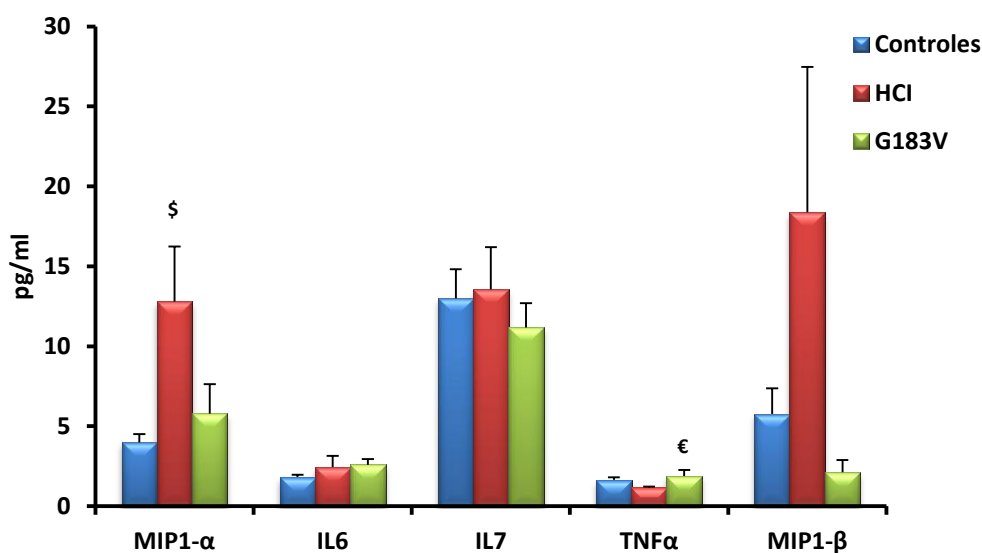


Figura 4.24: Comparación entre los valores medios de concentración de citoquinas plasmáticas entre los controles, los portadores de la mutación G183V y los del HCl. Media \pm EEM. \$= $p\leq 0,05$ Control frente HCl, €= $p\leq 0,05$ HCl frente a G183V.

Observamos concentraciones elevadas en plasma de la citoquina MIP-1 β de en los portadores frente a los controles de forma significativa ($p=0,034$) (figura 4.25). La citoquina MIP-1 α también presento valores más elevados aunque no llegó a ser de forma significativa.

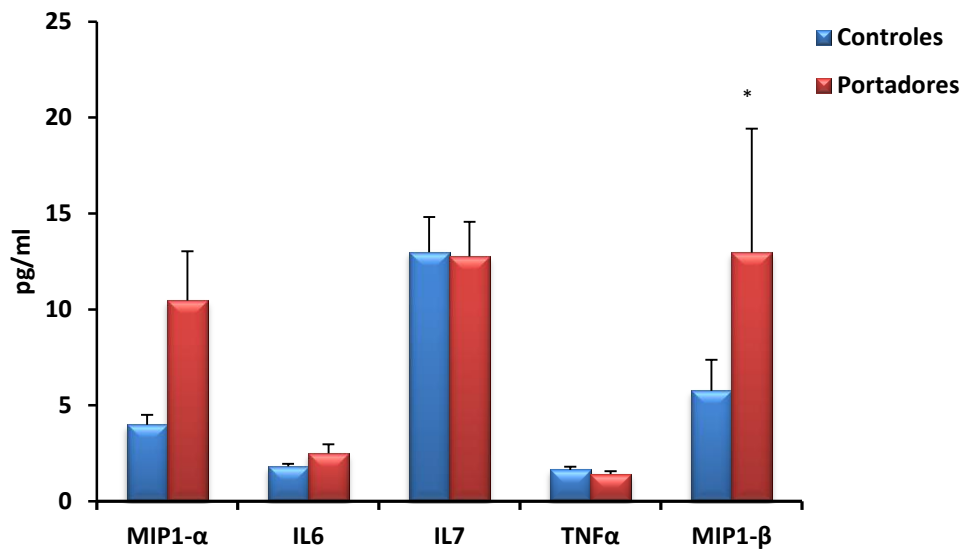


Figura 4.25: Comparación entre los valores medios de concentración de citoquinas plasmáticas entre los controles y los portadores. Media±EEM. * $p \leq 0,05$.

En los portadores varones de las variantes que forman el HCI se observó un aumento significativo en la citoquina MIP1β ($p=0,046$) frente a las mujeres portadoras del HCI y la mutación G183V (figura 4.26).

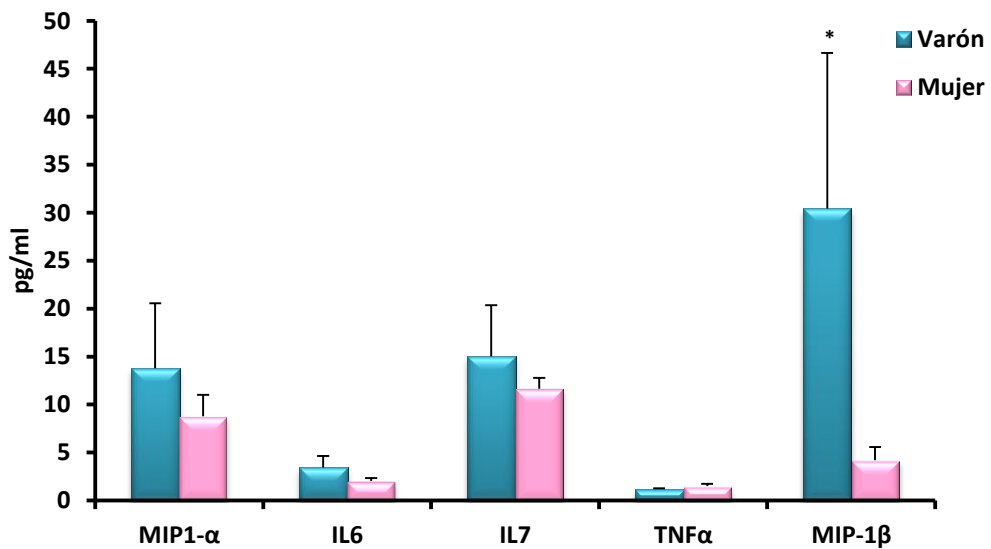


Figura 4.26: Comparación entre los valores medios de concentración de citoquinas plasmáticas entre los varones portadores del HCI y las mujeres portadoras del HCI y G183V. Media±EEM * $p \leq 0,05$.

No se observaron diferencias significativas en relación al sexo y la edad en el grupo control.

RESULTADOS

4.8 Análisis del perfil de galacto/glucoesfingolípidos en extractos de fibroblasto por HPTLC

A partir de los extractos celulares obtenidos según el protocolo detallado en el apartado 3.20.2 y el análisis de los galacto/gluco lípidos por la técnica HPTLC (ver 3.20.3) obtuvimos los siguientes cromatogramas. El perfil mostrado por los patrones fue el representado en la figura 4.27 donde aparecen los picos correspondientes a la Esfingomielina, Gb₃, Lactosilceramida y Glucosilceramida.

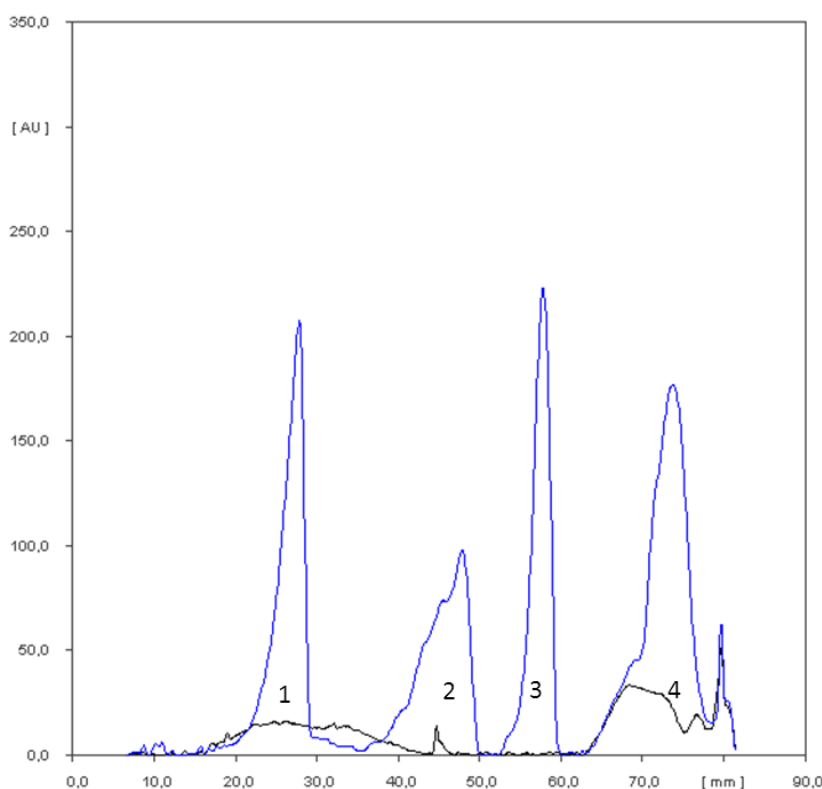


Figura 4.27: Cromatograma mostrado por la mezcla de patrones. En azul: 1) Esfingomielina, 2) Globotriaosilceramida (Gb₃), 3) Lactosilceramida, 4) Glucosilceramida. AU (Unidades de Absorbancia). En negro está representada la línea de base.

Se realizó el estudio en una muestra control y en una muestra del caso índice de la familia 1 portadora del HCl (F1.1). Se observó un perfil diferente entre la paciente portadora del HCl y la muestra control (figura 4.28). Como puede observarse, los picos de las muestras en relación a los patrones se encontraban ligeramente retrasados debido a la matriz. La muestra control mostro un perfil formado por tres picos en la región de la Esfingomielina (1), la Gb₃ (2) y la Glucosilceramida (5) mientras que el perfil de la muestra del caso índice (F1.1) estaba formado por cinco

picos. Los picos 1,2 y 5 coincidieron con el perfil mostrado por la muestra control pero a diferencia de esta mostró dos picos más (3,4) en la zona de la Lactosilceramida.

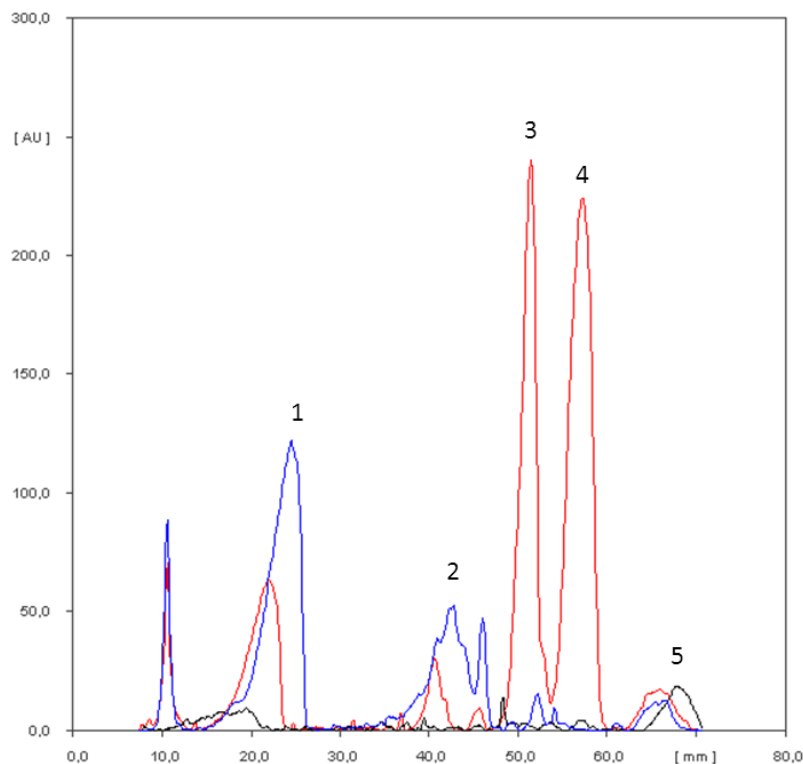


Figura 4.28: Cromatograma mostrado por la muestra control (azul) y la muestra de la paciente portadora del HCl (rojo). Control: 1) Esfingomielina, 2) Globotriaosilceramida (Gb_3), y 5) Glucosilceramida. HCl: 1) Esfingomielina, 2) Globotriaosilceramida Gb_3 , 3) y 4) galacto/glucoesfingolípidos sin caracterizar en la zona de la Lactosilceramida 5) Glucosilceramida. AU (Unidades de Absorbancia). En negro está representada la línea de base.

Se calculó el área debajo de la curva formada por la Gb_3 . Debido a que la proliferación celular era muy diferente entre las células del control y la paciente F1.1, las áreas se normalizaron con los valores de proteína cuantificados en los extractos celulares. Para el control se obtuvo un área de 2875 (UA) y una concentración de proteína de 3.7 mg/ml. Para el paciente F1.1 se obtuvo un área de 632 (UA) y una concentración de proteína de 1.4 mg/ml. No se observó un acúmulo mayor que el control de Gb_3 .

El pico número 3 coincidió con el patrón de la Lactosilceramida.

RESULTADOS

4.9 Análisis de la toxicidad para el fármaco 5-azacitidina en fibroblastos.

Para calcular el rango de toxicidad del fármaco 5-azacitidina se realizó un análisis de toxicidad con el reactivo Alamar blue, siguiendo el protocolo descrito en el apartado 4.9. La viabilidad celular, a las 72 horas, se mantuvo en el 100%, en el rango de concentración comprendido entre 0 y 12.5 μM . A partir de la concentración de fármaco 25 μM , la viabilidad celular descendió un 60% (figura 4.29).

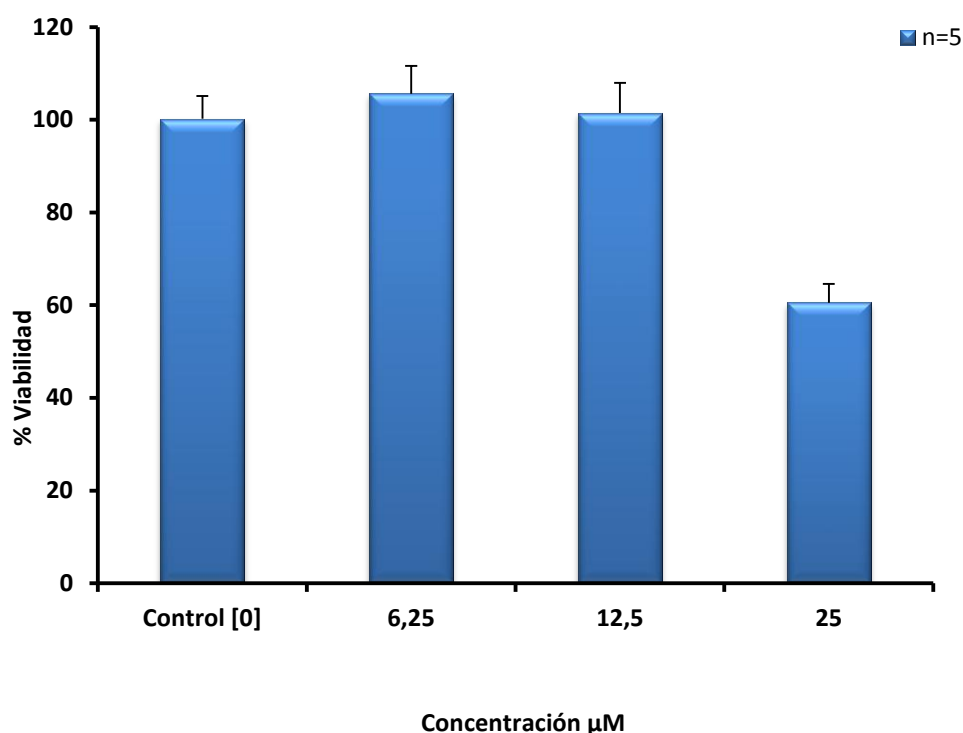


Figura 4.29: Ensayo de toxicidad en fibroblastos para el fármaco hipometilante 5-azacitidina (H20:AcOH) a las 72 horas (n=5).

4.10 Análisis de la proliferación celular en fibroblastos

Se analizó la proliferación celular de los fibroblastos obtenidos a partir de biopsias de piel de los individuos portadores del HCI: F1.1, F1.4, F1.3, de la mutación G183V: F2.1, F2.3 y un control siguiendo el protocolo descrito en el apartado 3.19 (figura 4.31). A las 24 horas de cultivo encontramos diferencias en el número de células por cm^2 que fueron significativas entre los portadores de la mutación G183V y el control frente a los portadores del HCI ($p \leq 0,05$). Las células del individuo F2.1 habían duplicado su población en tan solo 24 horas. Entre los portadores del HCI las células

del caso índice (F1.1) habían crecido más y de forma significativa ($p \leq 0,05$) con respecto a los varones hemicigotos F1.4 y F1.3.

El sexto día de crecimiento las células del portador F2.1 y F2.2 llegaron a su máxima confluencia (figura 4.30 y 4.31). A partir de ahí, se obtuvieron medidas de fluorescencia menores debido a que el metabolismo celular disminuye cuando las células entran en confluencia. Cabe destacar que observamos diferencias muy significativas ($p \leq 0,001$) entre el crecimiento de la población de células de F2.1 y todas las demás. También se observaron diferencias significativas del crecimiento celular control y los portadores de G183V con respecto a los portadores del HCI (figura 4.31).

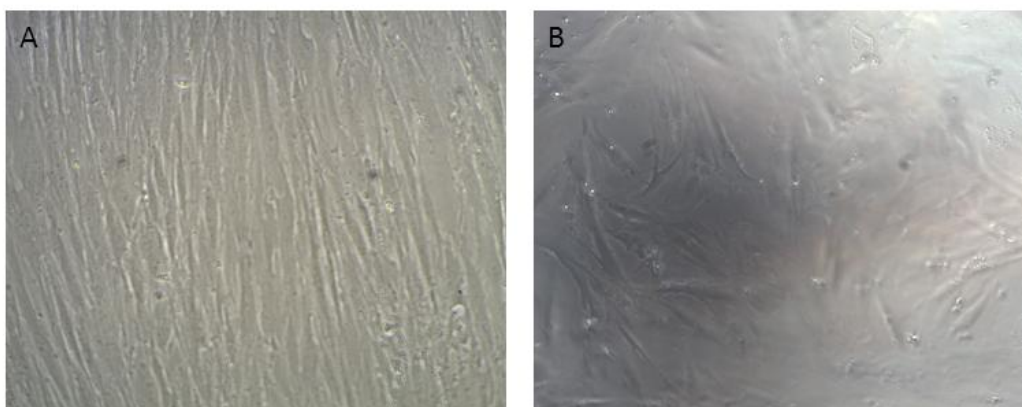


Figura 4.30: A) Cultivo de fibroblastos del portador F2.3 a día 6. B) Cultivo de fibroblastos del portador F1.1 a día 6.

Los cultivos de los portadores F1.1 y F1.4 aumentaron su población rápidamente a partir del día 10 de cultivo mientras que las células del portador F1.3 continuaban quiescentes el día 14. Se observaron diferencias significativas entre el crecimiento del portador F1.1 respecto a la de F1.3 y F1.4 ($p \leq 0,05$).

Se observó una alteración en el perfil de proliferación en los portadores del HCI con respecto al control y los portadores de la variante G183V.

RESULTADOS

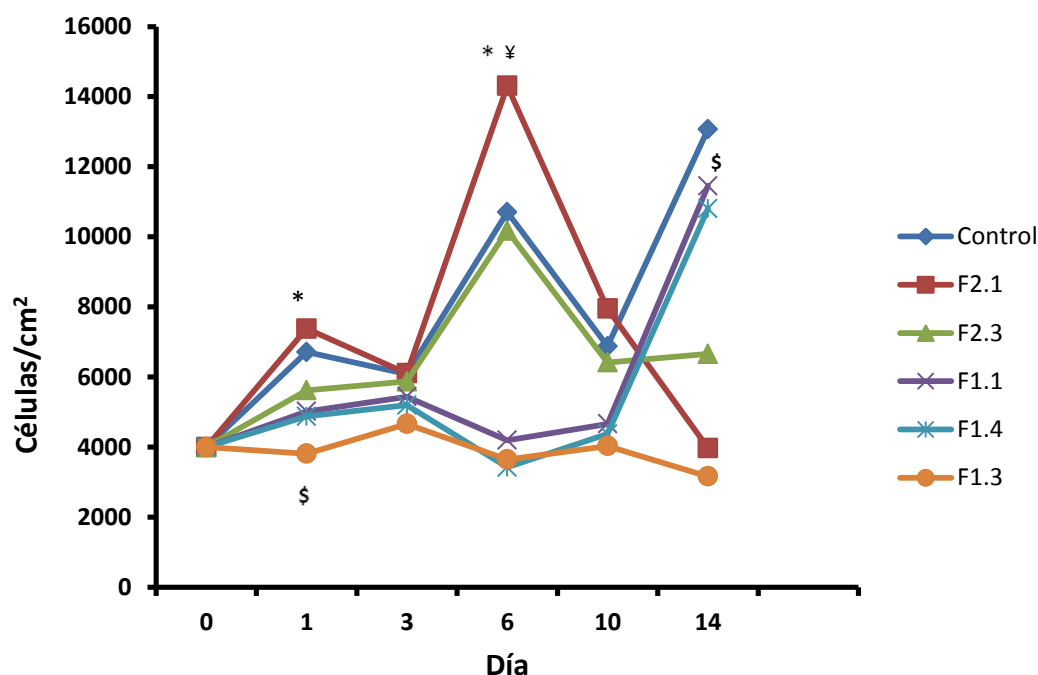


Figura 4.31: Perfil de proliferación celular del Control, los portadores del HCl (F1.1, F1.3, F1.4) y los de la variante G183V (F2.1, F2.3).*= $p \leq 0,05$ diferencias entre control y G183V frente HCl, \$= $p \leq 0,05$ diferencias entre F1.1 y F1.3, F1.4, ¥= $p \leq 0,001$ diferencias entre F2.1 y el resto (n=5).

4.11 Efecto del tratamiento con 5-azacitidina (AzaC) en cultivos primarios de fibroblastos

4.11.1 Análisis del perfil de activación del cromosoma X en cultivos primarios de fibroblastos bajo la acción de la 5-azacitidina.

Se llevó a cabo el análisis de activación del cromosoma X en cultivos primarios de fibroblastos según el protocolo descrito en el apartado 3.22.1. En las mujeres portadoras se analizó el porcentaje de activación del cromosoma X silvestre mediante la determinación de la metilación del alelo y se observó un perfil diferente de activación del alelo silvestre en la comparación del control frente a las portadoras. Se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de activación en función de la concentración de AzaC. En el sujeto F1.1 se observó una activación menor de forma significativa ($p \leq 0,05$) a la concentración de $6,25 \mu\text{M}$ de 5-aza, con respecto al cultivo sin fármaco mientras que para la concentración de $12,5 \mu\text{M}$ el perfil de activación aumento de forma significativa. Para los sujetos F2.1 y F2.3 se produjo una variación

del perfil muy similar. Los dos sujetos aumentaron la activación del cromosoma X silvestre de forma significativa a una concentración de 6,25 μM (figura 4.32).

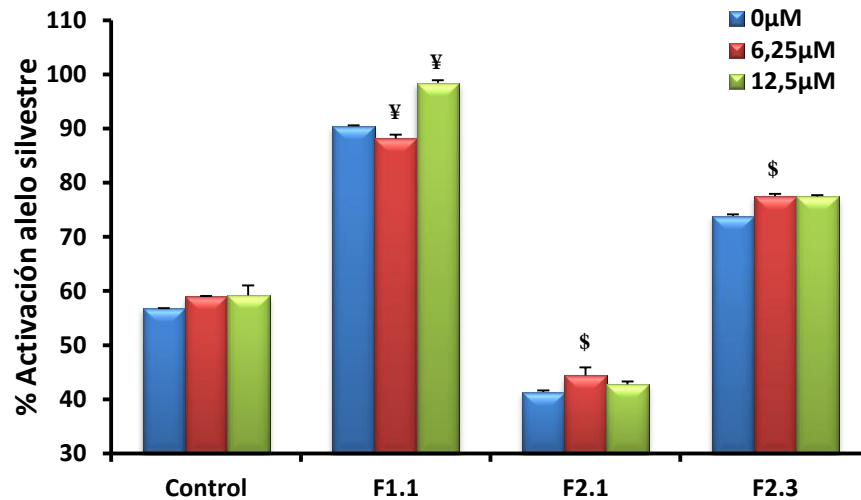


Figura 4.32: Perfil de activación del alelo silvestre. Media \pm EEM \$= $p \leq 0,05$ Diferencia entre la concentración 0 μM y la concentración 6,25 μM , ¥= $p \leq 0,05$ diferencias con respecto a las otras dos concentraciones.

Los perfiles de activación del alelo mutado para los portadores del HCl y G183V fueron imágenes especulares del alelo silvestre mientras que para el control se mantuvo (figura 4.33).

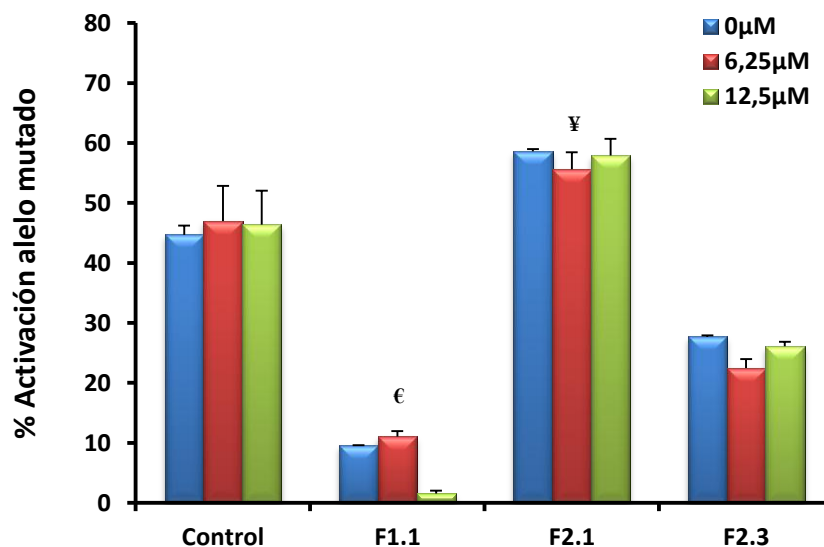


Figura 4.33: Perfil de activación del alelo mutado. Media \pm EEM €= $p \leq 0,05$ Diferencia entre la concentración 6,25 μM y 12,5 μM y la concentración, ¥= $p \leq 0,05$ diferencias con respecto a las otras dos concentraciones.

RESULTADOS

El porcentaje de activación del alelo mutado en las células del portador F1.1 y F2.1 para la concentración de AzaC 6,25 μ M fue significativo.

Para conocer si se produce la activación del alelo en el paciente F1.4 con la AzaC, al ser hemizigoto, se comparó la activación del cromosoma X frente una muestra control de DNA 0% metilado. Como puede observarse en la figura 4.34 se produjo un descenso de la activación del cromosoma X conforme se iba aumentando la concentración de AzaC y se observaron diferencias significativas con respecto a la concentración de 12,5 μ M.

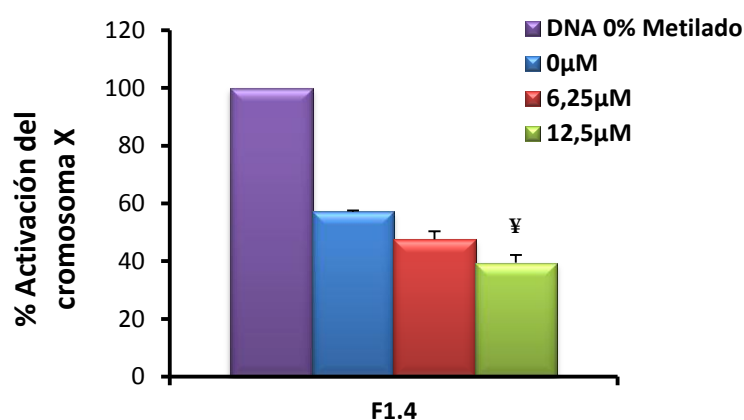


Figura 4.34: Perfil de activación del cromosoma X para un hemizigoto del HCl. Media \pm EEM. , ¥= $p \leq 0,05$ diferencias con respecto a las otras dos concentraciones.

4.11.2 Análisis de la expresión del gen *GLA* en cultivos primarios de fibroblastos bajo la acción de la 5-azacitidina

Una vez realizado el perfil de metilación del cromosoma X, se midió la expresión del transcrito *GLA* y el transcrito *GLA-M* en los cultivos de fibroblastos siguiendo el protocolo descrito en el apartado 3.22.2. En primer lugar, se realizó la cuantificación relativa del RNA mensajero de las células de cada sujeto tratadas a las distintas concentraciones utilizando como estándar interno la expresión del gen *GAPDH*. Se observó que no había diferencias significativas en la expresión del gen entre las células tratadas y sin tratar, lo que nos permitía utilizarlo como agente normalizador. La expresión del transcrito *GLA* aumento de forma significativa en el control y en las células procedentes de F2.1 para la concentración de 6,25 μ M mientras que para la concentración de 12,5 μ M también se observó un aumento de forma significativo con respecto a concentración 0 en esas dos muestras aunque en menor medida para el

sujeto F2.1. En las demás células de los sujetos (F1.1, F1.4 y F2.3) se observó una misma tendencia sin diferencias significativas (figura 4.35).

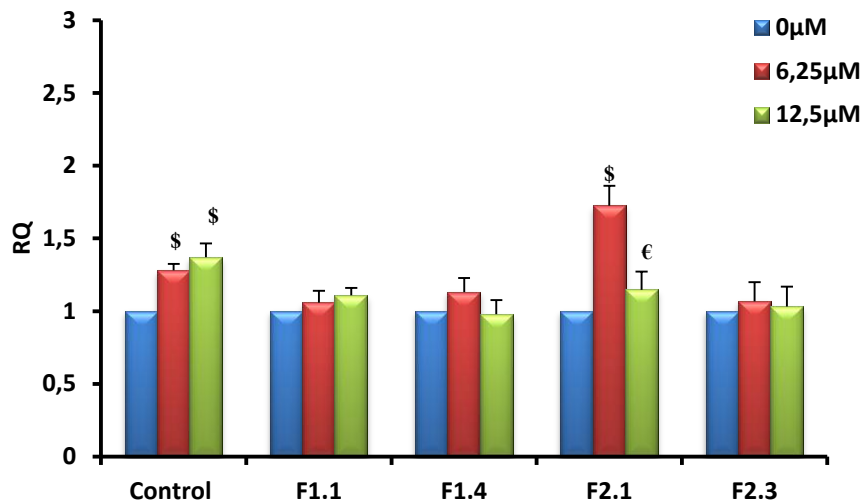


Figura 4.35: Perfil de expresión del gen *GLA* a las concentraciones 0, 6,25 y 12,5 μM. Media±EEM. , \$= $p \leq 0,05$ diferencias entre 0 y 6,25 μM, €= $p \leq 0,05$ diferencias entre 0 y 12,5 μM. La expresión del transcrito *GLA*-M, aumento de forma significativa en las células del control y en las de los sujetos F2.1 y F2.3 para la concentración de 6,25 μM mientras que para la concentración de 12,5 μM también se observó un aumento significativo en las células de los sujetos portadores de la mutación G183V (F2.1 y F2.3). En las células de F1.1 se observó una tendencia al alza para las dos concentraciones en cambio para las del sujeto F1.4 descendieron (figura 4.36).

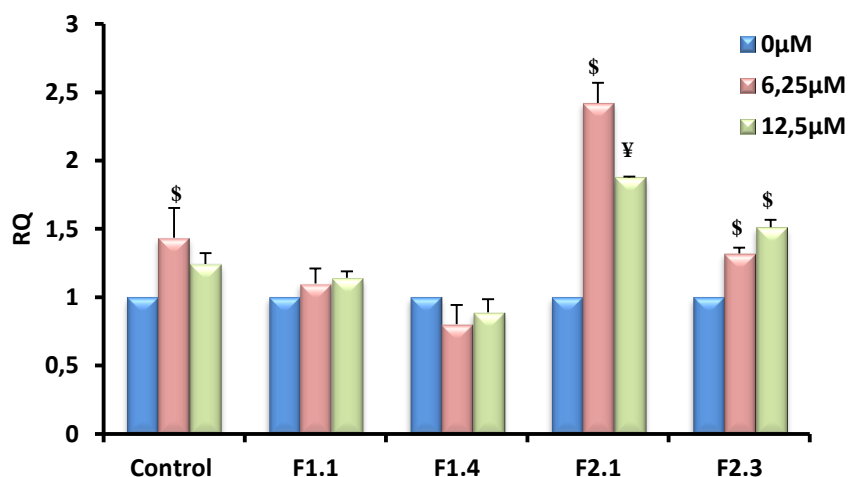


Figura 4.36: Perfil de expresión del transcrito *GLA*-M a las concentraciones 0, 6,25 y 12,5 μM. Media±EEM. , \$= $p \leq 0,05$ diferencias entre 0 y 6,25 μM, ¥= $p \leq 0,05$ diferencias con las otras dos concentraciones.

RESULTADOS

Para poder analizar la variación entre los dos transcritos se realizó la cuantificación relativa al control en función de la concentración de AzaC. En las células no tratadas se observó una baja expresión para el transcrito *GLA* en el sujeto F2.1, mientras que los sujetos F1.1 y F2.3 presentaban valores muy similares al control. El varón hemicigoto F1.4 presentó valores más altos con relación al control. El transcrito *GLA-M* estuvo en todos los casos expresado a la baja con respecto al control (figura 4.37)

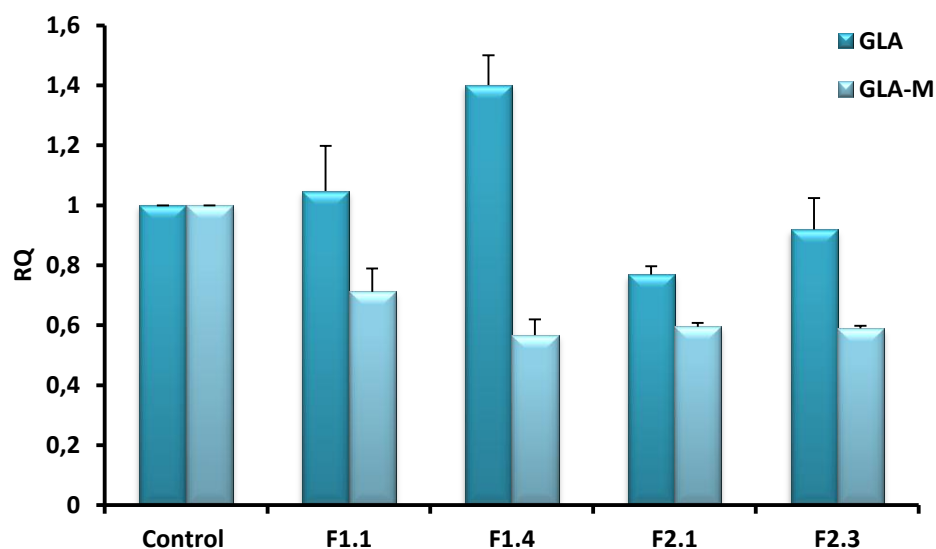


Figura 4.37: Perfil de expresión *GLA* y *GLA-M* sin el tratamiento (0 μ M). Media \pm EEM.

Se midió el perfil de expresión de los dos transcritos después de tratar las células a una concentración de 6,25 μ M. La expresión del transcrito *GLA* para los sujetos F1.1, F1.4 y F2.3 descendió con respecto al grupo sin tratar con relación al control, mientras que para el sujeto F2.1 se observó un aumento. La expresión de *GLA-M* aumentó para el sujeto F2.1 variando el perfil entre *GLA/GLA-M* (figura 4.38).

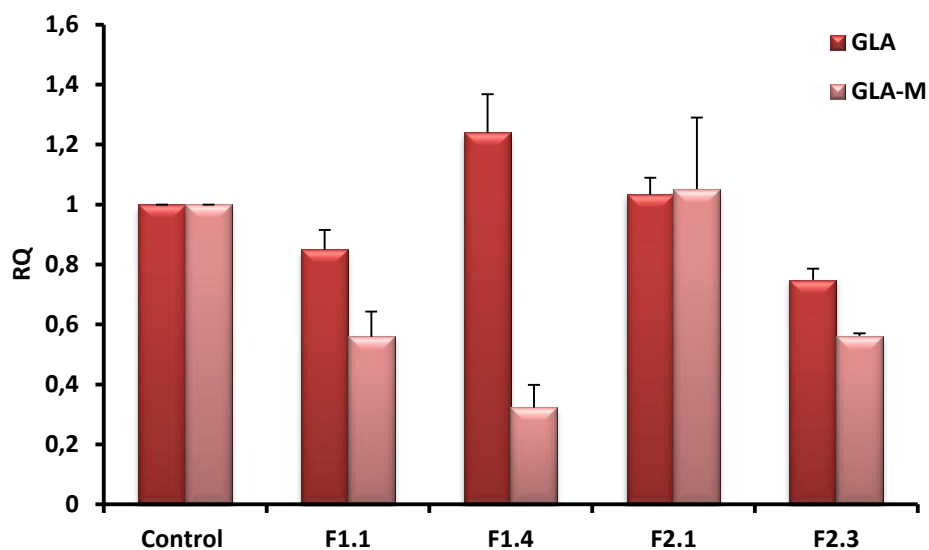


Figura 4.38: Perfil de expresión de *GLA* y *GLA-M* a una concentración de fármaco de 6,25 μ M. Media \pm EEM.

Cuando las células fueron tratadas a una concentración de 12.5 μ M de AzaC, se observó un cambio en los perfiles de expresión de los sujetos F2.1 y F2.3. Para los sujetos F1.1 y F1.4 mientras se observó un leve descenso de la expresión de *GLA* se produjo un aumento de *GLA-M* (figura 4.39).

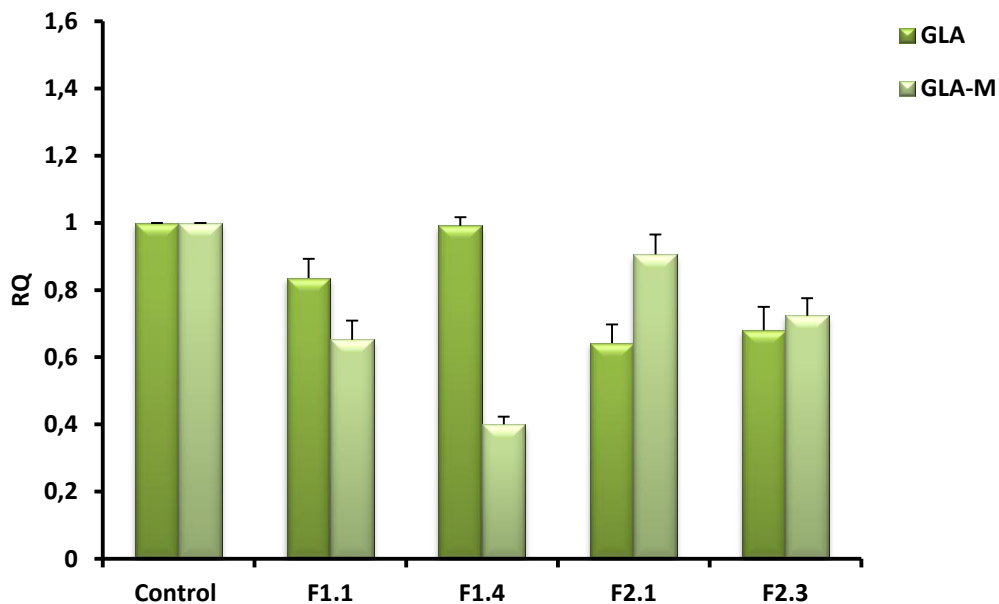


Figura 4.39: Perfil de expresión de *GLA* y *GLA-M* a una concentración de fármaco de 12,5 μ M.

RESULTADOS

4.12 Análisis de la actividad enzimática de la α -galactosidasa A en cultivos primarios de fibroblastos bajo la acción de la 5-azacitidina

El análisis de la actividad enzimática de los cultivos primarios de fibroblastos bajo la acción de las distintas concentraciones de fármaco hipometilante fueron llevadas a cabo siguiendo los pasos del protocolo descrito en el apartado 3.22.3.

Se consiguió mediante el tratamiento con AzaC un aumento de la actividad de forma significativa en las células de los sujetos control F2.1 y F2.3 para la concentración 6,25 μ M mientras que para la concentración 12,5 μ M se consiguió una variación de actividad para todos los sujetos de forma significativa excepto para el control (figura 4.40). Los valores de actividad sin tratamiento fueron significativamente más bajos que el valor de las células control, exceptuando al sujeto F1.4 (figura 4.41). Después de tratar con la 5-azacitidina a una concentración de 12,5 μ M se consiguieron recuperar los niveles de actividad excepto para la portadora F2.3, el aumento de la cual no fue suficiente para igualar los valores de la muestra control ya que partía de una actividad muy baja (figura 4.42).

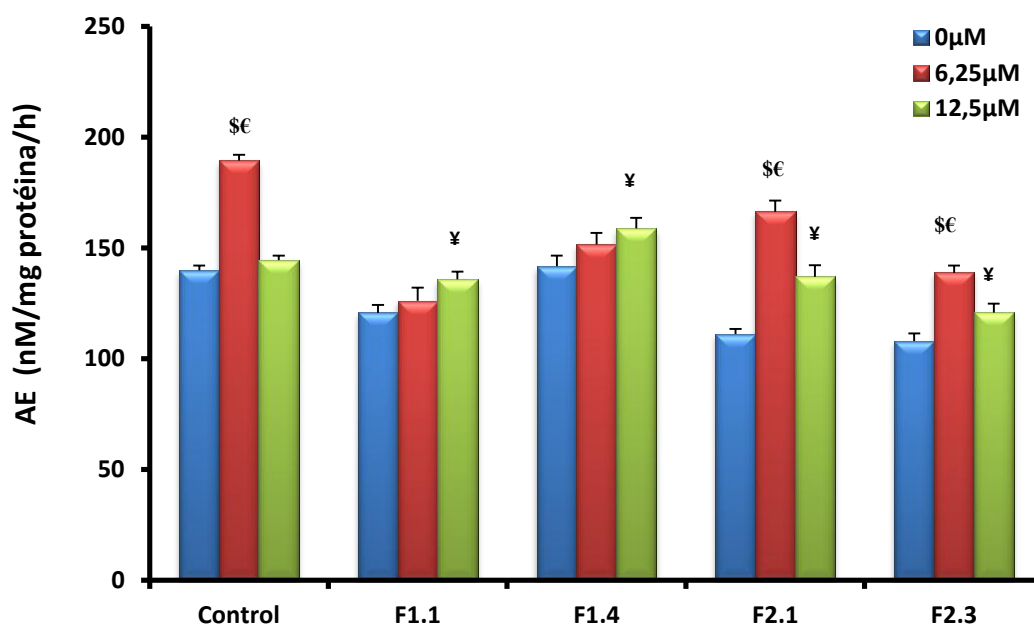


Figura 4.40: Variación de la actividad enzimática (AE) en fibroblastos a distintas concentraciones de AzaC. Media \pm EEM \$= $p\leq 0,05$ concentración 0 μ M frente a 6,25 μ M, €= $p\leq 0,05$ concentración 6,25 μ M frente a 12,5 μ M, ¥= $p\leq 0,05$ concentración 0 μ M frente a 12,5 μ M.

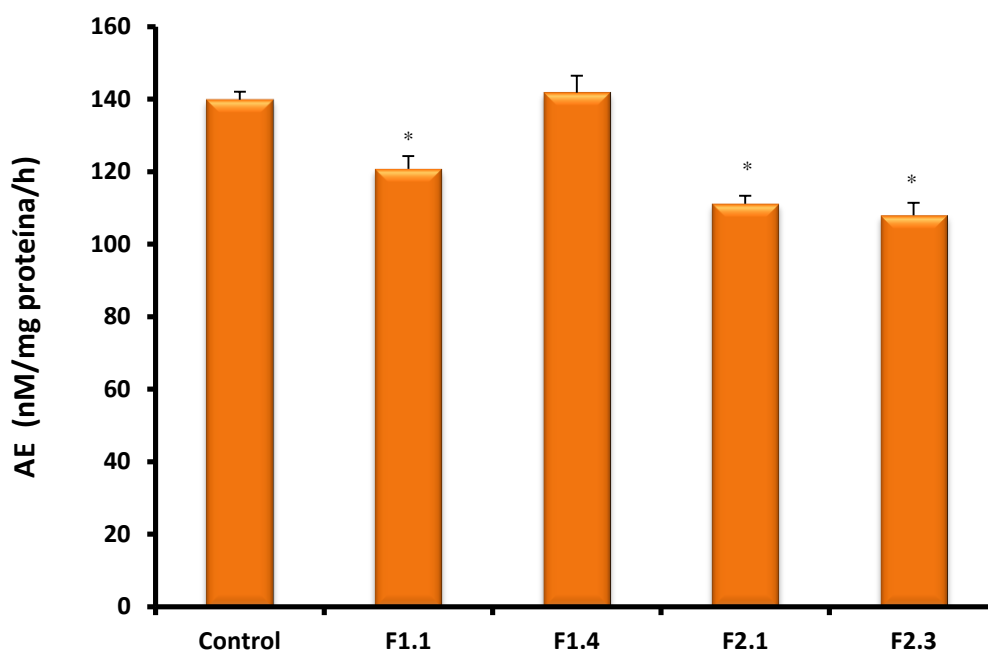


Figura 4.41: Actividad enzimática (AE) de los fibroblastos antes del tratamiento con 5-azacitidina. Media±EEM *= $p \leq 0,05$

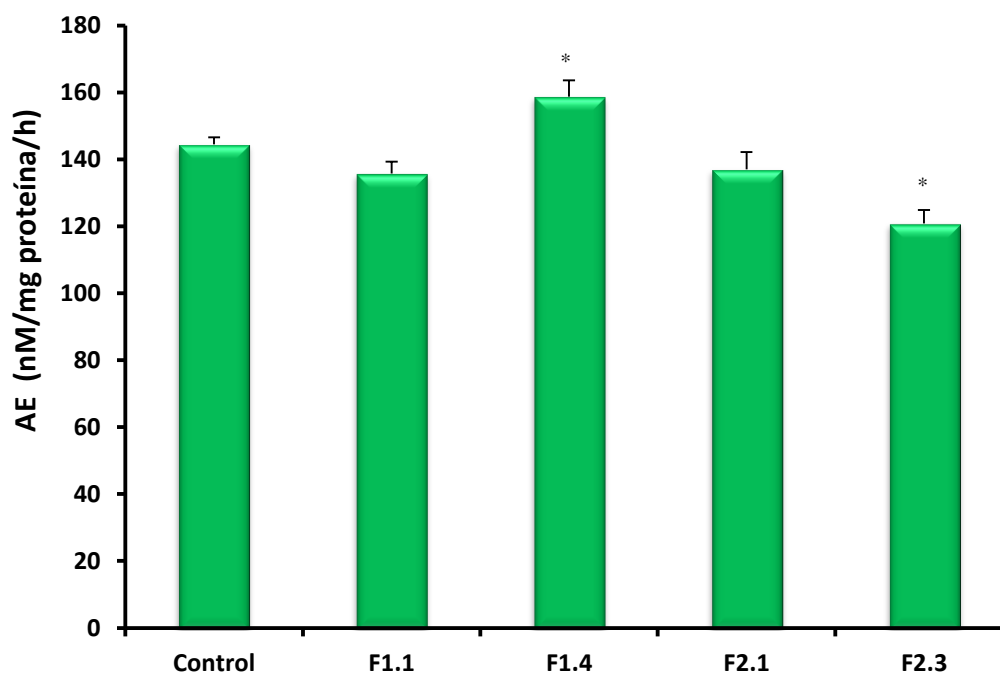


Figura 4.42: Actividad enzimática (AE) de los fibroblastos después del tratamiento con 5-azacitidina a una concentración de 12,5 µM. Media±EEM *= $p \leq 0,05$

Se calculó la tasa de variación de la actividad enzimática en porcentaje a las concentraciones de fármaco de 6,25 µM y 12,5 µM (figura 4.43). Se observó un aumento alrededor del 35% en el control a 6,25 µM mientras que para la de 12,5 µM

RESULTADOS

apenas se consiguió un aumento del 3%. Para los portadores de HCl (F1.1 y F1.4) se consiguió triplicar y doblar la actividad llegando a un aumento máximo del 12% para los dos sujetos a una concentración de 12,5 μM de AzaC. Para los sujetos portadores de la mutación G183V se consiguió un aumento en torno al 50% para la concentración de 6,25 μM en el sujeto F2.1, mientras que para el sujeto F2.3 el aumento fue del 28,5%. Para la concentración de 12,5 μM el efecto fue menor en los dos casos (un aumento alrededor del 23% en F2.1 y un aumento del 12% para F2.3).

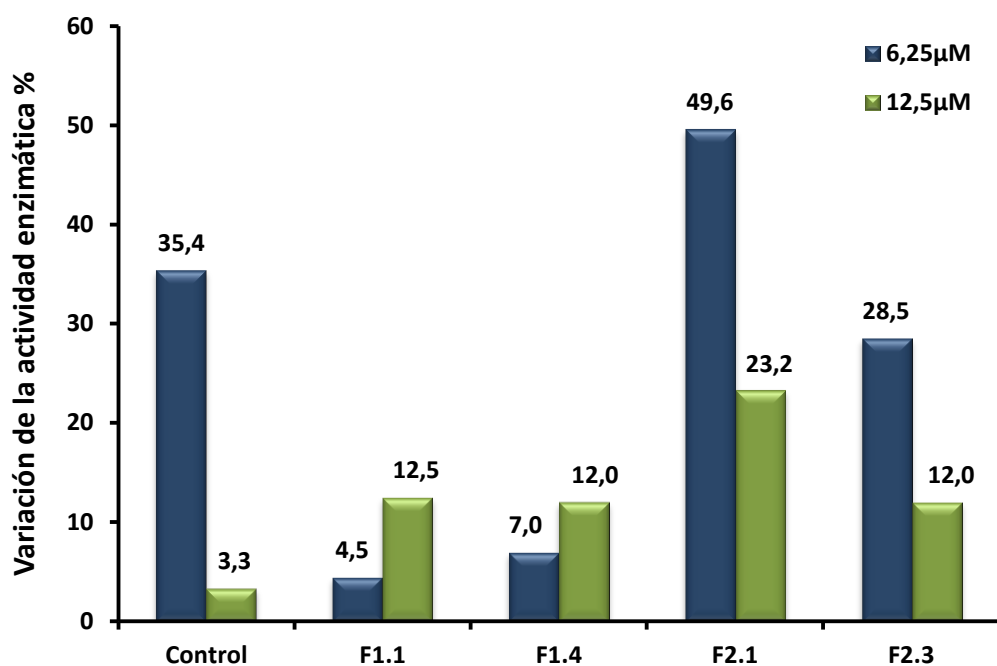


Figura 4.43: Tasa de la variación enzimática para las concentraciones de AzaC 6,25 μM y 12,5 μM .

DISCUSIÓN

5. Discusión

5.1 Identificación y caracterización de la herencia de variantes en EF

La detección de las mutaciones en el gen *GLA* es esencial para llevar a cabo el diagnóstico en la EF. Las mutaciones en regiones intrónicas pueden alterar el patrón de expresión del gen de tal manera que aparezcan diferentes fenotipos y manifestaciones clínicas de la enfermedad (Filoni, et al., 2008, Ishii, et al., 2002).

Las aberraciones intrónicas en el gen *GLA* no se suelen identificar, ya que por rutina, en principio solo se evalúa la región codificante y pequeñas regiones de los nexos exón-intrón por secuenciación automática; con lo cual la prevalencia en EF es posible que este subestimada (Hwu, et al., 2009, Spada, et al., 2006). En este estudio se identificó un haplotipo intrónico ISV-10C>T, ISV2-76_80del 5, ISV4-16A>G, ISV6-22C>T en la familia 1 secuenciando amplias zonas intrónicas. Esta familia presentó un fenotipo tardío de la enfermedad como se ha descrito en el apartado 4.1.1. Estudios previos encontraron este mismo haplotipo intrónico (HCI) o las variantes del mismo ISV2-76_80del 5, ISV4-16A>G, ISV6-22C>T asociadas a la EF con fenotipo tardío y manifestaciones clínicas distintas, incluyendo manifestaciones renales (Bekri, et al., 2005, Valbuena, et al., 2008) y afectaciones neurológicas (Tanislav, et al., 2011). En otro estudio en el que se analizaron un total de 740 sujetos con sospecha clínica de EF, el 12 % de ellos mostró polimorfismos en la zona promotora del gen *GLA*; dentro de ese grupo el 99% mostraba la herencia simultánea de otros polimorfismos a lo largo del gen, y el mismo HCI observado en la familia 1 se observó en el 9% del total de los casos estudiados (Bono, et al., 2011). Recientemente un estudio (Ferri, et al., 2012) llevado a cabo en 67 mujeres, con manifestaciones clínicas de EF, se identificaron cinco haplotipos en regiones no codificantes del gen *GLA*; el más frecuente fue el HCI con una prevalencia del 13,4%. Aunque existen evidencias de que la herencia de estos haplotipos está unida a la aparición de síntomas clínicos producidos por la EF, hasta la fecha no se han aportado datos consistentes sobre el posible efecto causante de la enfermedad producida por la herencia conjunta de estas variantes.

En el caso de la familia 2, detectamos una mutación puntual c.548 G>T (p.G183V) que estaba localizada en un sitio de ajuste en el exón 3, en la junta con el exón 4;

este aminoácido en la secuencia está muy conservado entre especies (figura 5.1) como *Homo sapiens*, *Rattus norvegicus*, *Mus musculus*, *Gallus gallus*, *Fugu rubripes*, *Tetraodon nigroviridis*, *Danio rerio*, *Anopheles gambiae*, *Drosophila melanogaster*, y *Caenorhabditis elegans*.

ESPECIE	181	Secuencia	204
<i>Homo sapiens</i>		ADGYKHMSLALNRTGRSIVYSCEW	
<i>Drosophila melanogaster</i>	GY	LN TG S VYSC W	
<i>Caenorhabditis elegans</i>	GY	LN TGR I YSC W	
<i>Rattus norvegicus</i>	GYK	MSLALNRTGRSIVYSCEW	
<i>Mus musculus</i>	GYK	M LALNRTGRSIVYSCEW	
<i>Gallus gallus</i>	A GY	MSLALN TGR IVYSCEW	
<i>Fugu rubripes</i>	GY	MS ALN TGRSIVYSCEW	
<i>Tetraodon nigroviridis</i>	GY	MS ALN TGRSI YSCEW	
<i>Danio rerio</i>	GY	MS ALN TGRSIVYSCEW	
<i>Anopheles gambiae</i>	GY	LN TGR YSC W	

Figura 5.1: Conservación del aminoácido en la posición 183 (glicina) de la secuencia de aminoácidos que codifica para la α -galactosidasa A.

Varias mutaciones han sido descritas con la capacidad de destruir o crear nuevos sitios de ajuste alterando el patrón fisiológico de expresión del gen *GLA* (Lai, et al., 2003). Se han descrito otras mutaciones para el residuo 183 como la mutación c.547 G>A en el exón 3, produciendo un cambio de aminoácido neutral, polar como la glicina por uno neutral no polar como la serina (p.G183S), y c.548 G>A en el exón 4, resultante en una sustitución de glicina por ácido aspártico (p.G183D). Estas dos últimas mutaciones descritas como mutaciones puntuales de cambio de aminoácido (Shabbeer, et al., 2002, Topaloglu, et al., 1999). Este hecho nos hizo pensar en la posibilidad de que la mutación pueda tener un efecto no únicamente estructural si no que puede tener también alterado el patrón de ajuste.

5.2 Identificación y caracterización del patrón de expresión del gen *GLA*

Para la identificación y caracterización del patrón de expresión del gen *GLA* se utilizó una herramienta informática que nos permitió realizar un estudio “*in silico*” de cómo se podía ver alterado el patrón de ajuste fisiológico con la herencia de las diferentes variantes descritas en las dos familias. Previamente, mediante el programa informático SSPNN, se describió que el cambio p.G183S podría generar la eliminación del exón 3 (Lai, et al., 2003). El análisis bioinformático utilizando el

DISCUSIÓN

programa SSPNN nos indicaba que, tal y como se detalla en el apartado de resultados 4.4.1, la herencia de las variantes ISV2-76_80del 5, ISV4-16A>G en la familia 1 y G183V en la familia 2 podía afectar los patrones de ajuste (“splicing”) en ambas.

Tras el intento fallido por caracterizar el patrón de ajuste anómalo generado por diferentes técnicas como la electroforesis en gel de poliacrilamida (4.4.3), secuenciación de todo el DNA codificante (3.11.4) y de regiones adyacentes a los exones afectados (3.11.2.2), posiblemente por la degradación prematura de las variantes de ajuste anómalas, se optó por utilizar la PCR cuantitativa.

En todos los portadores encontramos niveles bajos del transcrito codificante para proteína *GLA* de acuerdo con publicaciones previas (Filoni, et al., 2008, Nakao, et al., 1995). El transcrito detectado a partir de la sonda diseñada para detectar el fragmento clonado en el apartado 4.4.5, *GLA-M*, también mostró niveles alterados con respecto a los controles, es decir una baja expresión del gen que se traduce en una expresión a la baja del RNA mensajero inmaduro. Teniendo en cuenta que todas las variantes de ajuste provienen de un RNA mensajero inmaduro, el desbalance producido en la expresión por un ajuste alternativo se puede detectar a partir de la técnica de PCR cuantitativa. El caso índice de la familia 1 (F1.1), mujer heterocigota para el HCI, presentó niveles muy bajos en los dos transcritos, de forma significativa en comparación a su control. Este paciente mostraba un fenotipo cardíaco de la EF, sin embargo los niveles de actividad plasmática y en leucocitos, se mostraron completamente normales. Es bastante probable que la expresión en otros tejidos sea diferente. Se ha demostrado que la proporción del transcrito alternativo producido por la variante intrónica ISV4+919G>A en el RNA mensajero de la enzima α -galactosidasa A está más elevado en músculo humano y pulmón (Ishii, et al., 2002). El caso índice de la familia 2, una mujer heterocigota para la mutación G183V, presentó el patrón de ajuste más alterado en comparación con el control de forma significativa en los dos transcritos. Esta paciente mostraba una actividad enzimática de α -galactosidasa inferior al 50% de la del grupo control con un fenotipo renal. Nuestros resultados sugieren que la alteración del ajuste más el cambio de aminoácido producido por la variante G183V produce una acumulación más rápida de los glucoesfingolípidos.

También encontramos diferencias significativas entre la expresión de los dos transcritos entre los portadores y pacientes siendo la de estos últimos un 50% más bajos que en los portadores. En la comparación entre géneros, se vio disminuida la expresión del transcrito fisiológico de forma significativa en los hemicigotos frente a las portadoras heterocigotas. Estos resultados coinciden con otros estudios (Filoni, et al., 2008) en los que se propone la PCR cuantitativa como un método en el diagnóstico de EF en pacientes con variantes que tienen una actividad residual alta y en los que puede estar alterada la expresión del gen *GLA*.

Estos resultados encontrados en la PCR cuantitativa son concordantes con la previsión que indicaba el análisis “*in silico*”.

5.3 Sitios de unión a factores de transcripción en la zona promotora circundante a la variante IVSO-10C>T

Se ha estudiado la región promotora -68_+140 en la que queda englobado uno de los polimorfismos que conforman el HCI, ISV0-10C>T. Nuestros resultados (apartado 4.5.1), muestran que el complejo proteico del extracto nuclear es más fácilmente desplazado de la sonda correspondiente al alelo T con respecto al alelo C en presencia de un exceso de la sonda del alelo T frío. Esta variante ha sido asociada previamente a niveles bajos de expresión de α -Galactosidasa (Oliveira, et al., 2008). En nuestro trabajo los análisis “*in silico*” de la zona, muestran la alteración del sitio de unión para tres familias de factores de transcripción. La herencia del alelo minoritario T, produciría la desaparición del sitio de unión para esas proteínas. Las familias de factores de transcripción que mostró el programa fueron SNAPC, XBBF, DMRT.

SNAPC consiste en cinco subunidades que varían en su tamaño. Este factor de transcripción se une a la proteína Oct-1 y las proteínas de unión TATA (TBPs), las cuales son activadores de los snRNA (RNAs pequeños que intervienen en la maquinaria de ajuste) y las RNAs polimerasas (Sadowski, et al., 1996). Las dos proteínas estarían relacionadas con la regulación de la expresión del gen. La segunda familia es la X-BOX Binding Factors (XBBF). El factor de transcripción XBP-1 se expresa en respuesta durante el estrés producido en el retículo endoplasmático por un mal plegamiento de las proteínas uniéndose al elemento de respuesta de proteínas

desplegadas (UPRE) y activando los genes diana UPR (Iwakoshi, et al., 2003). La familia de genes MDTR humanos, codifican para una larga familia de factores de transcripción relacionados con las proteínas de *Drosophila* “Double Sex”. Expresadas principalmente en las gónadas, las proteínas DMTR contienen unos motivos de unión a DNA ricos en cisteína y tienen una función importante en el desarrollo gonadal (Hong, et al., 2007). Con lo cual tenemos por un lado una familia de factores que está relacionada directamente con la regulación de la expresión y otra en la que estaría involucrado el plegamiento de la proteína en el retículo endoplasmático.

No pudimos identificar el factor de transcripción debido a que no encontramos anticuerpos que habían sido testados previamente para realizar la técnica de súper retardo (“supershift”).

La variante IVS0-10 C>T también está situada en una isla CpG de la región promotora del gen *GLA*. Todas las mujeres son heterocigotas para la variante C; una inactivación epigenética del alelo, podría generar una prevalencia de la expresión del alelo T, facilitando el desarrollo de la enfermedad y dependiendo de la activación en cada tejido, podría generar un fenotipo distinto.

5.4 Estudio de la metilación de la región promotora del gen *GLA*

Los mecanismos de metilación son bien conocidos como modificadores de la expresión epigenética en las células. Estas modificaciones reversibles a partir de la metilación de las citosinas asociadas con la guanosina en dobletes CpG, median el control de la transcripción a través de los cambios conformacionales de la cromatina. Estos mecanismos están implicados en varios procesos biológicos, como la regulación y desarrollo de los tejidos (Robertson and Wolffe, 2000). En este trabajo estudiamos la región promotora del gen *GLA* que contenía una isla CpG con varias posiciones de metilación, comprendida entre las posiciones -68 +140 del gen. Debido al efecto de la inactivación del cromosoma X, no hemos encontrado una metilación significativa en los hombres con respecto a las mujeres aunque si se puede observar un perfil de metilación residual mínima, diferente para los pacientes varones de EF con respecto a la muestra control. Eso indicaría que existe una regulación también por metilación en el caso de los hombres aunque menos apreciable que en las

mujeres, debido a que el efecto de metilación para la compensación de la expresión génica en mujeres, es mucho mayor. Observamos varias posiciones de metilación en el promotor que rodean a variantes con perfiles de metilación diferentes que nos permiten diferenciar de forma significativa entre sujetos sanos y portadores en la posición -32 y en la -6, mientras que los pacientes tienen un perfil diferente en -32 y en la -30 (ver resultados 4.6.1). También encontramos perfiles asociados a los dos tipos de variantes, HCI y G183V que nos permiten distinguir entre sujetos sanos y las dos variantes, y también perfiles que nos permiten diferenciar las dos variantes entre sí. Con lo cual una variación en la metilación en estas regiones reguladoras del gen están asociadas al desarrollo de la enfermedad. La posición -30 es una posición polimórfica, ISV0-30G>A [rs3027584]. Está descrito como el cambio producido en esa posición (G>A), está asociado a una cantidad elevada de actividad en plasma (Fitzmaurice, et al., 1997). Los estudios del RNA mensajero “*in vitro*” sugieren que el cambio actúa potenciando la transcripción probablemente porque se produce la ruptura de un sitio de unión para algún factor de transcripción no identificado. Nuestros resultados demuestran que también es un sitio de regulación epigenética. La ruptura de este sitio por cambio de la base impediría la metilación debido a que la adenina no se metila, y como consecuencia, podría aumentar la activación del gen, lo que estaría de acuerdo con una actividad más alta de lo normal en plasma y células (Fitzmaurice, et al., 1997). Como se ha comentado en el apartado 5.3, la activación epigenética de estas variantes en esta región promotora puede hacer que el efecto de un alelo sea prevalente al otro en mujeres heterocigotas desarrollando un fenotipo u otro de la enfermedad en dependencia del órgano o tejido en el que se encuentra inactivado. Se ha publicado la presencia de varios polimorfismos relacionados con síntomas de EF en la región promotora (ISV0-12 G>A [rs3027585], ISV0-10C>T [rs2071225]) todos ellos dentro de la región estudiada en nuestro estudio (Bono, et al., 2011). Todas estas variantes están encuadradas en la región de unión de factores de transcripción de la región promotora de *GLA*.

5.5 Determinación de la inactivación del cromosoma X

Uno de los grandes problemas del diagnóstico en la EF se basa en que las mujeres portadoras, pueden ser asintomáticas o desarrollar la enfermedad desde un fenotipo

leve a un fenotipo grave y no se conoce ningún procedimiento que nos permita predecir el desarrollo potencial de la enfermedad.

Desde los primeros momentos del desarrollo embrionario se produce una inactivación de uno de los dos cromosomas X para compensar la expresión génica con respecto al varón. Los patrones de inactivación en mujeres son específicos de tejido, con lo cual la determinación de la activación/inactivación de los alelos puede ser una herramienta útil para el diagnóstico preciso en mujeres portadoras y el estudio en la evolución de la enfermedad. El gen del receptor de andrógenos humano, HUMARA, suele ser utilizado para estudios de activación del cromosoma X. El gen del receptor de andrógenos contiene marcadores tipo “short tandem repeat” (STR) en el primer exón (Edwards, et al., 1992, Kuiper, et al., 1989) los cuales están enclavados en una región regulada por metilación en una isla CpG (Tilley, et al., 1989). Las enzimas de restricción HpaII y HhaI reconocen los sitios de corte en los sitios de metilación circundantes a los marcadores STR y ha sido descrita una correlación entre la inactivación del cromosoma X y estos sitios de corte (Allen, et al., 1992). Nosotros diseñamos una técnica que nos permite amplificar DNA no metilado de la región en la que se encuentran esos marcadores en el gen del receptor de andrógenos, cuantificarlo y genotiparlo de tal manera que podamos relacionar el grado de activación del alelo portador de las variantes sin necesidad de utilizar enzimas de restricción. Para ello realizamos el estudio en todas las portadoras y correlacionamos la actividad enzimática con la activación del cromosoma X portador de la variante. No obtuvimos ninguna correlación que fuera significativa. Estos resultados son concordantes con los de otro estudio en el que se han analizado 77 mujeres heterocigotas para mutaciones de Fabry y no se encuentra ninguna correlación entre la activación del cromosoma X mutado, la actividad enzimática, la edad o síntomas clínicos de la enfermedad (Elstein, et al., 2012). A diferencia de otros estudios en los que se utilizan enzimas de restricción para amplificar el DNA no metilado; nosotros diseñamos una PCR metil específica que nos permite amplificar DNA tratado con bisulfito no metilado (ver apartado 3.14.2.1). De este modo evitamos el uso de enzimas de restricción, que pueden dar resultados falsos por una incompleta digestión, mientras que la amplificación con DNA tratado con bisulfito aumenta la sensibilidad del método (Uchida, et al., 2000). Este

procedimiento también lo utilizamos para comprobar la variación del perfil de metilación del cromosoma X en el uso de terapia hipometilante como aproximación terapéutica.

Aunque no hemos encontrado relación entre la clínica o actividades enzimáticas en plasma o leucocitos, en los estudios “*in vitro*”, en cambio el perfil de metilación del cromosoma X, si coincide en relación a la actividad enzimática en cultivos de fibroblastos. Es probable que dependiendo del tejido exista una relación entre la activación del cromosoma X y el fenotipo del paciente, estando más afectado el órgano dependiendo del perfil epigenético (ver apartado 4.11.1).

5.6 Actividad enzimática en EF

El análisis de la actividad enzimática no es un buen procedimiento para poder diagnosticar a las mujeres heterocigotas, ni todos aquellos casos en los que la actividad enzimática residual es alta, como es en nuestro caso, que partimos de la herencia de un HCI en la familia 1, que no altera la enzima estructuralmente si no su expresión y esta depende del órgano o tejido. Como se ha observado en nuestro estudio, no existe una correlación entre el estado de activación en sangre del cromosoma X ni del fenotipo con la actividad enzimática medida en leucocitos, ni en plasma (ver apartado 5.2 y 5.5). En cambio nosotros si encontramos descensos significativos en todos los cultivos de fibroblastos primarios con respecto al control (portadores F1.1, F1.4, F2.1 y F2.3). Cabe señalar que para el paciente F1.3, los fibroblastos, también presentaron valores bajos de actividad, pero esta no alcanzó una diferencia significativa. Especialmente en el caso índice de la familia 1 (F1.1) en la que se encontraron niveles de actividad enzimática en sangre y en plasma normales, en fibroblastos se encuentran niveles significativamente menores que en el grupo control. Se ha observado que en los fibroblastos de piel existe un nivel de acúmulo de glucoesfingolípidos más elevado (Kanekura, et al., 2005). El perfil de glucoesfingolípidos en los fibroblastos de la paciente F1.1, mostró dos picos elevados (en proceso de ser caracterizados) en la región de la lactosilceramida que no aparecían en la muestra control. Estos podrían corresponder a algún tipo de galactósido, ya que por ejemplo, la estructura de la galabiosilceramida (Ga₂) solo difiere de la lactosilceramida en la posición de un grupo hidroxilo y debería quedar

en la misma zona del cromatograma. En pacientes con enfermedad de Fabry se ha visto un acúmulo mayor de Ga₂ con respecto a Gb₃ (Mills, et al., 2005). El análisis de la actividad enzimática en fibroblastos puede resultar de un gran apoyo en el diagnóstico de variantes con actividad enzimática residual alta.

5.7 Relación genotipo-fenotipo

El análisis de la relación genotipo-fenotipo en la EF es sumamente complicado debido a diversos motivos comentados previamente (ver apartado 1.3.2). En este trabajo se describen dos familias que presentan clínica de EF con los diferentes fenotipos (clásico y tardío). La familia 1 es portadora de un HCI. Aunque aún no se ha demostrado cual es la relación entre este haplotipo y la aparición de síntomas y signos de la enfermedad hay varias publicaciones en las que se deja entrever una relación del haplotipo con la clínica de EF, relacionada con un fenotipo que se desarrolla de una forma más lenta que el fenotipo clásico, no siendo por eso menos grave. La herencia de este haplotipo complejo ha sido descrito ligada a estudios de cribado en afectaciones de fibra nerviosa fina (Tanislav, et al., 2011), en afectación renal (Valbuena, et al., 2008) y en pacientes con síntomas de EF (Bono, et al., 2011). La familia 1 presenta un fenotipo tardío y dentro de la cual encontramos el caso índice (F1.1) con fenotipo cardíaco mientras que el paciente F1.4 presenta un fenotipo renal. Recientemente se ha publicado un artículo en el que se describe a una paciente de 41 años con fenotipo clásico asociado a fenotipo cardíaco producido por la herencia del HCI (Pisani, et al., 2012) lo que indica que este haplotipo complejo puede tener diferentes manifestaciones clínicas de la EF. Es evidente que hay un componente adicional que favorece el desarrollo a un fenotipo u otro y que hace que dentro de una misma familia existan varios tipos de afectación como la cardíaca y la renal. Es probable que este componente sea un factor epigenético que es modificado dependiendo del medio al que está expuesto el individuo.

En el caso de la familia 2 observamos la herencia de una mutación puntual, G183V, asociada a un fenotipo clásico de EF (Germain, et al., 2002, Shabbeer, et al., 2002). En esta familia se observa un fenotipo renal; en el caso del paciente F2.4 y en el caso índice F2.2, una mujer heterocigota para la mutación también con síntomas cardíacos. En el caso de las mujeres se complica el diagnóstico debido al

componente de inactivación del cromosoma X. Dentro de la misma familia su hermana F2.1 y la madre F2.3 son portadoras de la misma mutación aunque no han desarrollado síntomas de la enfermedad.

5.8 Búsqueda de nuevos biomarcadores

Actualmente uno de los campos de la investigación básica en la EF de más alta prioridad es la búsqueda de nuevos biomarcadores y técnicas para un diagnóstico temprano, que nos permitan realizar el seguimiento de la enfermedad, ya que los marcadores que existen no sirven en muchos de los casos. En este trabajo la búsqueda se ha abordado desde diferentes puntos de vista como son la epigenética (estudio de perfiles de metilación en la región promotora de *GLA* y perfil de activación del cromosoma X) (apartado 5.4 y 5.5), regulación transcripcional (citoquinas), expresión génica (variación de la expresión del RNA mensajero de *GLA* por PCR cuantitativa) (apartado 5.2), análisis enzimático en otros tejidos; como las biopsias de piel, y la metabolómica (detección de galacto/glucoesfingolípidos por HPTLC).

Existen varios estudios en los que se han observado niveles de citoquinas en plasma/suero elevados, en enfermedades lisosomales, debido al componente proinflamatorio generado por el acúmulo de sustrato en los lisosomas (Barak, et al., 1999). En pacientes de EG se han visto niveles elevados de MIP-1 α y MIP-1 β en muestras de suero (van Breemen, et al., 2007). En este estudio analizamos un perfil de citoquinas con el objetivo de encontrar algún candidato que nos sirviera para el diagnóstico y seguimiento de la enfermedad. Encontramos concentraciones plasmáticas elevadas de forma significativa de MIP-1 α en la comparación del grupo de varones hemicigotos frente al grupo de mujeres portadoras. Cuando comparamos la concentración de MIP-1 β también observamos concentraciones plasmáticas elevadas en la comparación del grupo control frente al grupo portador y por último la concentración de TNF- α fue superior en los portadores de G183V frente a los portadores del HCl. Aunque partimos de un número de casos pequeño (habría que confirmarlo con un número mayor de casos), MIP-1 α se erige como uno de los candidatos posibles como nuevo biomarcador para la EF coincidiendo con los resultados encontrados en otras enfermedades lisosomales como la EG (van

DISCUSIÓN

Breemen, et al., 2007). Los MIP (proteínas proinflamatorias de los macrófagos) pertenecen a la familia de los factores quimiotácticos. Los más comunes MIP-1 α y MIP-1 β son comúnmente conocidos como CCL3 y CCL4. Estos son cruciales para la respuesta inmunológica y la migración de los monocitos a través del tejido endotelial, pudiendo estar involucrados en los eventos cerebrovasculares (Tatara, et al., 2009).

Por último se han utilizado técnicas para poder analizar el perfil de acúmulo de sustrato en diferentes muestras biológicas. Se decidió utilizar cultivos de fibroblastos como apoyo al diagnóstico. La demostración del incremento del acúmulo de sustratos, puede ser muy útil para realizar un diagnóstico fiable y poder realizar el seguimiento de la enfermedad y efectividad de la terapia. Aunque el producto predominante es la Gb₃ también se puede producir el acúmulo de otros metabolitos como liso-Gb₃ o la galabiosilceramida (Ga₂). Mediante la técnica del HPTLC se realizó la separación de los diferentes galacto/glucoesfingolípidos y observamos que en los sujetos de la familia 1, portadora del HCI, aparecía un perfil totalmente diferente al del control. Aparecían dos picos más que en el perfil de la muestra control, que como se ha comentado anteriormente, están en proceso de ser caracterizados. Uno de los picos podría corresponder a la galabiosilceramida. Esta molécula compuesta por dos moléculas de galactosa unidas a la ceramida, solo se diferencia de la estructura de la lactosilceramida en la posición de un grupo hidroxilo, debido a que esta última está formada por galactosa, glucosa y ceramida, con lo cual el patrón de la lactosilceramida, debería de coincidir con el patrón de la galabiosilceramida. Curiosamente al cuantificar la cantidad de Gb₃ en esta muestra en comparación con el control observamos que la cantidad de Gb₃ es mayor en el control que en la propia muestra de enfermo de Fabry. Este patrón puede ser debido a que la desregulación de gen produce una cantidad de enzima insuficiente para poder llevar a cabo la degradación de otros metabolitos como la Ga₂ quedado acumulado este último o generando un acúmulo de otras isoformas como la liso-Gb₃. Se han encontrado niveles significativos de Ga₂ y sus isoformas en sedimentos urinarios de pacientes heterocigotos y en hemocigotos atípicos (Touboul, et al., 2005) y se han visto pacientes en los que mientras los niveles de Gb₃ eran normales se había producido un acúmulo mayor de Ga₂ (Mills, et al., 2005). De esta forma quedaría

demostrado totalmente que la herencia del HCI produce EF y el análisis de extractos celulares puede ser utilizado para diagnosticar los casos atípicos de la enfermedad. Actualmente se sigue trabajando en la caracterización de los dos picos presentados por el perfil de la paciente portadora del HCI (F1.1), el análisis de la familia portadora de la mutación G183V y en la puesta a punto de métodos enzimáticos con la enzima recombinante humana, que nos ayude a aportar el dato definitivo que demuestre que la aparición de esos perfiles, son debido a una mal función relacionada con las variantes heredadas en el gen *GLA*.

5.9 Estudios de la proliferación celular

Para poder realizar los estudios “*in vitro*” en fibroblastos se decidió estudiar la proliferación celular de las diferentes líneas de fibroblastos de cada sujeto. En estos experimentos se pudo observar claramente como las células de la familia portadora del HCI tenían alterada la proliferación celular (ver apartado 4.10). A las 24 horas de cultivo ya existían diferencias significativas en el crecimiento de los cultivos de las células de los sujetos F1.1, F1.3 y F1.4, con un crecimiento menor con respecto al control y los sujetos de la familia portadora de la mutación G183V. Dentro de los sujetos de la familia portadora del HCI se observaron diferencias significativas entre la proliferación de la mujer portadora F1.1 y los hombres F1.4 y F1.3. Las células de la mujer portadora se multiplicaban más rápido que las de los varones. Posiblemente la alteración producida por el haplotipo intrónico pueda estar alterando el metabolismo celular. En cambio las células de la familia portadora de la G183V llegaron a la confluencia en el día 6, menos de la mitad del tiempo que necesitaban las células portadoras del HCI. Se ha descrito como puede haber algún factor de crecimiento en el plasma de los pacientes de EF que puede aumentar la proliferación de los cardiomiocitos (Barbey, et al., 2006). De igual modo esto podría estar sucediendo en las células del portador F2.3. Cabe señalar que no encontramos ninguna explicación posible a la alteración del crecimiento celular en la familia 1 relacionada con la EF.

5.10 Nueva aproximación terapéutica mediante el uso de agentes hipometilantes en la EF

En EF existen alrededor de 600 mutaciones de las cuales un gran número de ellas son mutaciones de cambio de aminoácido que a pesar de tener la estructura alterada son catalíticamente competentes (Garman and Garboczi, 2004, Shabbeer, et al., 2002). Las mutaciones influyen en el plegamiento de las conformaciones intermedias de las proteínas y estas siguen la vía de degradación asociada al retículo endoplásmico (ERAD) y finalmente enviadas al proteosoma en el citosol, donde son degradadas. Otra gran parte son mutaciones que alteran el patrón de expresión de la enzima, dependiendo del tejido, reduciendo su cantidad (Ishii, et al., 2002). De todos modos, no existe una correlación entre las mutaciones y el fenotipo de la enfermedad. Como hemos visto en este trabajo dentro de una misma familia, con las mismas variantes, encontramos diferentes fenotipos. Este hecho se ha demostrado incluso en gemelos monocigóticos (Redonnet-Vernhet, et al., 1996). El fenotipo de la enfermedad va más allá de la simple herencia de una mutación y pueden tener un peso mayor, los mecanismos de regulación génica, como son la epigenética. Si este hecho se confirma, con técnicas que nos den información sobre el perfil epigenético del paciente y fármacos que nos permitan restablecer este perfil, seríamos capaces de tratar los fenotipos del paciente generando así una medicina totalmente personalizada. Recientemente se ha publicado un trabajo en el que se consigue restablecer la actividad enzimática de la glucocerebrosidasa ácida en líneas de fibroblastos primarios con las mutaciones más prevalentes en la EG mediante el uso de fármacos hipometilantes (Lu, et al., 2011). Para ello se utilizaron inhibidores de las desacetilasas de histonas (HDACi). El mecanismo de acción de estos fármacos se basa resumidamente en acetilar las histonas, de tal modo que se neutraliza la carga positiva de las histonas, perdiendo la interacción con la carga negativa del DNA y de ese modo se produce una descondensación de la cromatina favoreciendo el acceso a los factores de transcripción. Los HDACi son fármacos que actúan en la proteostasis celular y de ese modo pueden aumentar el plegamiento de proteínas mutantes en la EG. En nuestro caso hemos utilizado el compuesto HDACi, 5-azacitidina (AzaC). Este es un fármaco que actúa inhibiendo de forma irreversible la metilación del DNA, mediante la formación de un intermedio de reacción estable con la metilasa.

La 5-azacitidina es un fármaco con una amplia experiencia en clínica para el tratamiento del síndrome mielodisplásico, aprobado por la FDA desde el año 2006 y por la EMA desde el 2008. Comercializado bajo el nombre de Vidaza (Celgene), el fármaco solo se incorpora al DNA de nueva síntesis. Se decidió realizar una prueba de concepto con este fármaco hipometilante debido a su experiencia clínica y conocimiento de su mecanismo de acción. Es una alternativa más segura que otros agentes hipometilantes con una experiencia clínica menor. Este hecho, nos podría permitir pasar a la fase clínica para el tratamiento de EF con una mayor rapidez.

Para analizar el efecto del fármaco hipometilante AzaC “*in vitro*”, se puso en práctica el protocolo descrito en el apartado 4.11. Analizamos la actividad enzimática en las concentraciones 0, 6,25 y 12,5 μM donde se observó que la viabilidad celular era máxima, ya que a partir de 12,5 μM la viabilidad decaía al 60%. Se pudo observar un aumento mayor de la actividad enzimática en todos los cultivos para la concentración de 6,25 μM mientras que la variación para la concentración de 12,5 μM fue menor en todos los casos excepto para las células de los sujetos portadores del HCI en las que el defecto genético se basa en un fallo de regulación del gen (ver resultados 4.12). El control tratado bajo una concentración de 12,5 μM apenas varió su actividad. Cuando analizamos las tasas de variación, observamos que existía un efecto dependiente de la dosis de AzaC. Al doblar la dosis de 6,25 a 12,5 μM , la tasa de variación de la actividad enzimática se duplicaba (aproximadamente) en los sujetos de la familia portadora del HCI mientras que se reducía a la mitad en la familia portadora de la mutación G183V. Dependiendo del tipo de variantes nos encontramos con un perfil de activación muy diferente. Para el control aumentaba significativamente a una concentración de 6,25 μM mientras que para 12,5 μM casi no variaba. En los portadores del HCI se producía un aumento progresivo mientras que para los portadores de la mutación G183V se observó un perfil muy parecido al que presentó el control pero con una activación para la concentración de 12,5 μM cuatro veces mayor. Es posible que la diferente alteración de la regulación del gen *GLA* con respecto a las mutaciones haga que se observe un comportamiento diferente en los perfiles de la activación enzimática de las células portadoras de G183V y HCI respecto a las del control sano.

DISCUSIÓN

Para comprobar estos resultados, se analizó la expresión del gen *GLA* y de sus transcritos alternativos del mismo modo que en el estudio “*in vivo*” y también se analizó la variación del perfil de activación del cromosoma X. El perfil de activación del cromosoma X silvestre coincidió totalmente para los portadores de la mutación G183V, es decir la activación del alelo sano concordaba con el perfil de aumento de la actividad mientras que el perfil de activación del cromosoma X mutado era una imagen especular del cromosoma activo. En el caso de los portadores del HCI la paciente F1.1, mujer heterocigota, se ajustó más al patrón de activación enzimático que el del paciente F1.1, varón hemicigoto, al que el patrón de activación del cromosoma X fue inversamente proporcional al patrón de activación enzimático. Es decir, conforme aumentaba la actividad, descendía la activación del alelo. Hay que tener en cuenta dos cosas. Por una parte estamos analizando realmente la metilación del receptor de andrógenos y son células de un varón. No hay compensación génica debido a que es portador de un único cromosoma X. En el cromosoma X activo el gen *Xist*, que se encarga de bloquear a *Tsix* para que no desactive al cromosoma se encuentra hipermetilado (bloqueado) (ver introducción 1.3.4). Si el fármaco desestabilizase este bloqueo el único cromosoma X se inactivaría con fatales consecuencias para la célula. Es posible que el receptor de andrógenos este influenciado por el mismo mecanismo regulador que el gen *Xist*.

Los estudios de expresión mostraron de partida un perfil de expresión del RNA mensajero que se ajustaba al perfil de actividades, coincidiendo con resultados anteriormente publicados (figura 4.37) (Filoni, et al., 2008, Nakao, et al., 1995). Al aumentar la concentración de fármaco a 6,25 μM aumentaba la expresión de los transcritos en todas las células. A la concentración de 12,5 μM el aumento fue menor excepto en las células del control y del sujeto F1.1. La expresión de *GLA-M* para la concentración de 6,25 μM varió aumentando en todos los casos excepto para las células del sujeto F1.4 que disminuyó. Para la concentración de 12,5 μM el incremento de la expresión en la mayoría de los casos fue menor excepto para las células del portador F2.3 con respecto a la concentración de 6,25 μM . En la evolución de los perfiles con respecto al control normalizado para cada concentración, se observa como el perfil *GLA/GLA-M* en los portadores del HCI para las distintas concentraciones es prácticamente el mismo mientras que para los

portadores de G183V varía conforme aumenta la concentración de AzaC (figura 4.38, 4.39, 4.40).

Hay que tener en cuenta la influencia de la proliferación celular sobre la eficiencia del fármaco ya que la AzaC actúa en la formación de nuevo DNA. Esto conlleva a que el efecto sobre el fármaco “*in vitro*” sea más visible en las células de un sujeto u otro. En el caso de las células de F2.1 la proliferación celular era mucho mayor que las de todos los sujetos, mientras que el control y F2.3 la tenían muy parecida, F1.1 y F1.4 tenían la proliferación afectada, con lo cual el efecto debería de ser menos visible.

Los portadores del HCI tienen el mismo perfil de actividad y expresión de los transcritos. La mujer heterocigota, conforme aumenta la hipometilación del cromosoma X silvestre, aumenta la cantidad de RNA mensajero codificante, lo que se traduce en una mayor expresión de la proteína, en cambio para el sujeto F1.4 (varón, por lo tanto hemizigoto para el HCI); a menor expresión se produce un aumento de la actividad enzimática. Podemos concluir que es posible que se esté produciendo algún tipo de regulación post transcripcional. En un principio se pensó que los intrones del gen podían estar involucrados en la regulación del mismo de tal manera que cuando hay una variación en la regulación epigenética del gen o en la expresión, se autorregularía dependiendo del patrón de ajuste y de la desactivación de la expresión. El aumento de la expresión se podría compensar a partir de la acción de RNAs no codificantes que forman parte de los intrones de *GLA*. Para ello analizamos “*in silico*” mediante el programa informático mfold (University at Albany, NY) (ver enlaces) las posibles estructuras de los intrónes con y sin las variantes del HCI. Observamos que para la variante de intrón 6 en los enfermos de EF se producía una estructura que era muy parecida a la estructura que se genera en los microRNAs primarios (figura 5.2). Los microRNAs son moléculas de RNA pequeñas que inhiben la expresión génica a nivel post transcripcional (Chen and Rajewsky, 2007).

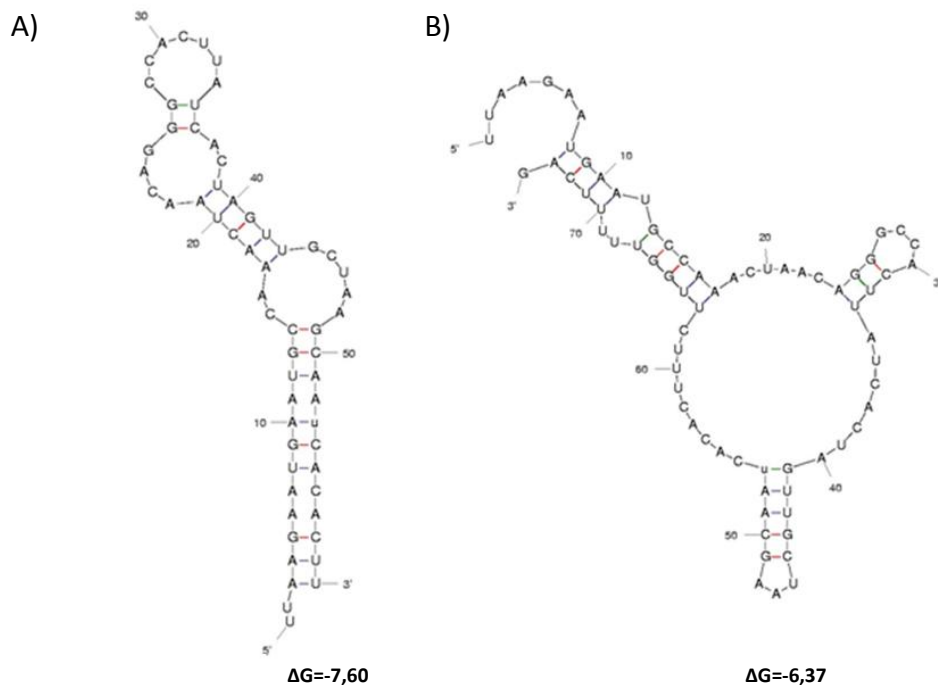


Figura 5.2: Estructuras generadas por la variante ISV6-22C>T A) El alelo T, genera una estructura muy similar a la formada por los precursores de los miRNAs B) Estructura más estable formada por el alelo C.

De tal manera que dependiendo del perfil de ajuste alternativo del RNA mensajero se pueden producir RNAs que inhiban la expresión del gen mediante la unión de algún RNA pequeño como por ejemplo algún miRNA. En este caso la variación del perfil de ajuste, favorece la expresión del gen ya que había menor cantidad del RNA intrónico que regula la expresión del gen. Si observamos los perfiles de expresión de los dos transcritos en la familia portadora del HCI conforme aumenta la concentración de fármaco la diferencia de expresión entre los dos se va acortando. Para la familia G183V se aprecia un cambio en el perfil de expresión entre los dos transcritos. Este resultado es coincidente con los resultados obtenidos en el estudio “*in silico*” sobre la posibilidad de un ajuste alternativo para esta mutación que se sumaría al efecto de cambio de aminoácido alterando la expresión de la enzima.

Basándonos en nuestros resultados tendríamos un haplotipo formado por cuatro variantes que intervendrían en un paquete de regulación de la expresión del gen. La variante ISV-10C>T, interviene disminuyendo la expresión del gen, las variantes ISV2-76_80del 5, ISV4-16A>G, intervendrían en el patrón de ajuste desregulando el

perfil de expresión de los transcritos del RNA mensajero. Por otra parte la variante ISV6-22C>T, podría intervenir en la represión de la expresión por la vía post transcripcional a través de un RNA pequeño haciendo que la combinación de estos tres efectos sea causal de EF.

Los resultados sugieren que dependiendo del tipo de variantes que presente el paciente, el fármaco actuaría aumentando la expresión de la enzima por diferentes vías de regulación del gen y dependiendo del perfil de activación del alelo sano. Por otro lado podríamos tratar con el fármaco a portadores de mutaciones que alteran la regulación del gen incluso para los varones hemizigotos a diferencia del tratamiento con chaperonas, que solo nos permite el tratamiento de pacientes con mutaciones estructurales.

5.11 Hipotesis sobre la afectación multiorgánica en EF

En este trabajo se ha tratado de caracterizar y profundizar sobre los mecanismos moleculares que conllevan al desarrollo de la EF mediante el estudio de la herencia de una mutación puntual y la herencia de variantes intrónicas. Sin embargo quedan múltiples preguntas sin resolver. Uno de los puntos que quedan por resolver es, el por qué se produce la afectación multiorgánica en la EF. Los tejidos con una mayor afectación en la EF son el vascular, renal, cardíaco y nervioso. Probablemente los tejidos más vascularizados son los más afectados pero, si la fuente mayoritaria de Gb₃ proviene de la degradación de los eritrocitos senescentes en el hígado, ¿porqué no observamos un efecto producido por el acúmulo en ese tejido? Es posible que los derivados de los globósidos que cumplen un papel importante en la célula, sean reciclados, para viajar a los distintos tejidos donde al estar afectado el reciclaje queden retenidos produciendo las distintas morbilidades en la EF o sencillamente estén más expresados en el tejido vascular dependiendo de la necesidad del tejido al que vascularizan.

Los glucoesfingolípidos forman parte de las membranas celulares. Son moléculas complejas, altamente reguladas y tienen funciones muy importantes durante el desarrollo y la diferenciación celular, mediando en una gran cantidad de procesos, como la transducción de señal y las interacciones célula-célula (Lopez and Schnaar, 2009, Yu, et al., 2009). El concepto de que solo cumplen funciones estructurales es

totalmente erróneo. Son moléculas “bioactivas” en los eventos de señalización celular transmembrana y como mensajeros intracelulares secundarios (Stancevic and Kolesnick, 2010).

Consecuentemente los glucoesfingolípidos están involucrados en los mecanismos fisiopatológicos de varios agentes infecciosos, ya que un número elevado de toxinas procariotas solo actúan con la interacción de los glucoesfingolípidos apropiados en la membrana de las células (Hannun and Obeid, 2008). Uno de esos patógenos es la bacteria *E. coli* enterohemorrágica. El patógeno, una vez accede al torrente sanguíneo por la vía entérica, produce toxinas de tipo “Shiga” (Johnson and Nolan, 2009, Nataro and Kaper, 1998). Este tipo de toxina se une a los receptores de membrana CD77 (Gb₃) y se internaliza en las células endoteliales preferentemente de las células del tejido microvascular del glomérulo renal y del sistema nervioso central, inhibiendo la síntesis de proteínas y consecuentemente la muerte celular. Las células endoteliales del glomérulo renal son componentes de la barrera de filtrado glomerular y las alteraciones pueden producir fenómenos trombóticos y proteinuria (Ballermann, 2007, Patrakka and Tryggvason, 2010) desencadenando el fallo renal.

Algunos patógenos han evolucionado utilizando estos receptores como puerta de entrada al organismo. Esto nos da una idea de la importancia de Gb₃ en el tejido vascular, con lo cual una alteración en el reciclado de estas moléculas producido por el defecto genético del gen *GLA* puede estar relacionada con la afectación de esos tejidos, dependiendo del nivel de interacción con el tejido vascular. La posibilidad de amortiguar esa desregulación vendría dada por fenómenos epigenéticos y de regulación génica que nos hacen más o menos susceptibles a la exposición de factores ambientales.

CONCLUSIONES

6. Conclusiones

El análisis de los resultados obtenidos de nuestros estudios nos permite concluir que:

- 1- En los individuos portadores del haplotipo complejo intrónico se detecta una actividad α -galactosidasa A residual alta en leucocitos de sangre periférica y plasma mientras que en fibroblastos se observa actividad baja.
- 2- No existe relación entre la herencia del haplotipo complejo intrónico y la expresión fenotípica de la enfermedad de Fabry ni tampoco con la mutación G183V.
- 3- La herencia de las variantes del haplotipo complejo intrónico y la mutación G183V está asociada a la alteración en los patrones de expresión de los transcritos del gen *GLA* siendo la técnica de PCR cuantitativa un método útil en el diagnóstico de enfermedad de Fabry producida por este tipo de variantes.
- 4- La variante ISV0-10C>T ubicada en el promotor del gen *GLA* está directamente implicada en la regulación de la expresión del gen; se encuentra situada en una secuencia de unión de proteínas a DNA.
- 5- Los perfiles de expresión del transcrito silvestre y el transcrito no codificante de *GLA* y los análisis “*in silico*”, indican que las variantes ISV2-76_80del5 e ISV4-16A>G y la mutación G183V modifican el perfil de ajuste (“splicing”) del RNA inmaduro.
- 6- El estudio de los perfiles de metilación de la zona promotora del gen *GLA* muestra diferencias significativas entre los individuos portadores de las variantes comentadas, pacientes de Fabry y controles sanos.
- 7- Las concentraciones plasmáticas de las citoquinas MIP-1 α y MIP1- β se encuentran elevadas y pueden ser biomarcadores potenciales para la EF.
- 8- La distribución de los esfingolípidos (esfingomielina, Gb₃, lactosilceramida y glucosilceramida) en los extractos celulares de fibroblastos procedentes de los individuos portadores del haplotipo complejo intrónico, difiere de la observada en controles sanos.
- 9- Se ha conseguido aumentar de forma significativa “*in vitro*” la actividad enzimática y la expresión de α -galactosidasa A en cultivos de fibroblastos

de portadores del haplotipo complejo intrónico y de la mutación G183V mediante la adición del fármaco hipometilante 5-azacitidina.

BIBLIOGRAFÍA

7. Bibliografía

- Abe, A., S. Gregory, L. Lee, P. D. Killen, R. O. Brady, A. Kulkarni, and J. A. Shayman. 'Reduction of Globotriaosylceramide in Fabry Disease Mice by Substrate Deprivation', *J Clin Invest* **Vol. 105, No. 11**, 1563-71, 2000.
- Abe, A., S. R. Wild, W. L. Lee, and J. A. Shayman. 'Agents for the Treatment of Glycosphingolipid Storage Disorders', *Curr Drug Metab* **Vol. 2, No. 3**, 331-8, 2001.
- Aerts, J. M., J. E. Groener, S. Kuiper, W. E. Donker-Koopman, A. Strijland, R. Ottenhoff, C. van Roomen, M. Mirzaian, F. A. Wijburg, G. E. Linthorst, A. C. Vedder, S. M. Rombach, J. Cox-Brinkman, P. Somerharju, R. G. Boot, C. E. Hollak, R. O. Brady, and B. J. Poorthuis. 'Elevated Globotriaosylsphingosine Is a Hallmark of Fabry Disease', *Proc Natl Acad Sci U S A* **Vol. 105, No. 8**, 2812-7, 2008.
- Allen, R. C., H. Y. Zoghbi, A. B. Moseley, H. M. Rosenblatt, and J. W. Belmont. 'Methylation of Hpaii and Hhai Sites near the Polymorphic Cag Repeat in the Human Androgen-Receptor Gene Correlates with X Chromosome Inactivation', *Am J Hum Genet* **Vol. 51, No. 6**, 1229-39, 1992.
- Allfrey, V. G., R. Faulkner, and A. E. Mirsky. 'Acetylation and Methylation of Histones and Their Possible Role in the Regulation of Rna Synthesis', *Proc Natl Acad Sci U S A* **Vol. 51**, 786-94, 1964.
- Altarescu, G. 'Clinically Relevant Examples of Genotype-Phenotype Correlation', In D. Elstein, G. Altarescu and M. Beck (Eds.), *Fabry Disease*, Springer, 2010.
- Anderson, W. 'A Case of Angeio-Keratoma', *Brit J Dermatol*, 113-117, 1898.
- Aoshima, T., Y. Sekido, T. Miyazaki, M. Kajita, S. Mimura, K. Watanabe, K. Shimokata, and T. Niwa. 'Rapid Detection of Deletion Mutations in Inherited Metabolic Diseases by Melting Curve Analysis with Lightcycler', *Clin Chem* **Vol. 46, No. 1**, 119-22, 2000.
- Asfaw, B., J. Ledvinova, R. Dobrovolny, H. D. Bakker, R. J. Desnick, O. P. van Diggelen, J. G. de Jong, T. Kanzaki, A. Chabas, I. Maire, E. Conzelmann, and D. Schindler. 'Defects in Degradation of Blood Group a and B Glycosphingolipids in Schindler and Fabry Diseases', *J Lipid Res* **Vol. 43, No. 7**, 1096-104, 2002.
- Auray-Blais, C., D. Cyr, K. Mills, R. Giguere, and R. Drouin. 'Development of a Filter Paper Method Potentially Applicable to Mass and High-Risk Urinary Screenings for Fabry Disease', *J Inherit Metab Dis* **Vol. 30, No. 1**, 106, 2007.
- Bach, G., E. Rosenmann, A. Karni, and T. Cohen. 'Pseudodeficiency of Alpha-Galactosidase A', *Clin Genet* **Vol. 21, No. 1**, 59-64, 1982.
- Ballermann, B. J. 'Contribution of the Endothelium to the Glomerular Permselectivity Barrier in Health and Disease', *Nephron Physiol* **Vol. 106, No. 2**, p19-25, 2007.
- Barak, V., M. Acker, B. Nisman, I. Kalickman, A. Abrahamov, A. Zimran, and S. Yatziv. 'Cytokines in Gaucher's Disease', *Eur Cytokine Netw* **Vol. 10, No. 2**, 205-10, 1999.
- Barba-Romero, M. A., P. Deegan, R. Giugliani, and D. Hughes. 'Does Geographical Location Influence the Phenotype of Fabry Disease in Women in Europe?', *Clin Genet*, 2010.

- Barbey, F., N. Brakch, A. Linhart, N. Rosenblatt-Velin, X. Jeanrenaud, S. Qanadli, B. Steinmann, M. Burnier, T. Palecek, J. Bultas, and D. Hayoz. 'Cardiac and Vascular Hypertrophy in Fabry Disease: Evidence for a New Mechanism Independent of Blood Pressure and Glycosphingolipid Deposition', *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **Vol. 26, No. 4**, 839-44, 2006.
- Beck, M. 'Demographics of Fos – the Fabry Outcome Survey', In A. Mehta, M. Beck and G. Sunder-Plassmann (Eds.), *Fabry Disease: Perspectives from 5 Years of Fos*, Pharmagenesis, 2006.
- Beck, M. 'Overview', In D. Elstein, G. Altarescu and M. Beck (Eds.), *Fabry Disease*, Springer, 2010.
- Bekri, S., A. Enica, T. Ghafari, G. Plaza, I. Champenois, G. Choukroun, R. Unwin, and P. Jaeger. 'Fabry Disease in Patients with End-Stage Renal Failure: The Potential Benefits of Screening', *Nephron Clin Pract* **Vol. 101, No. 1**, c33-8, 2005.
- Bernstein, H. S., D. F. Bishop, K. H. Astrin, R. Kornreich, C. M. Eng, H. Sakuraba, and R. J. Desnick. 'Fabry Disease: Six Gene Rearrangements and an Exonic Point Mutation in the Alpha-Galactosidase Gene', *J Clin Invest* **Vol. 83, No. 4**, 1390-9, 1989.
- Bird, A. 'Dna Methylation Patterns and Epigenetic Memory', *Genes Dev* **Vol. 16, No. 1**, 6-21, 2002.
- Black, D. L. 'Mechanisms of Alternative Pre-Messenger Rna Splicing', *Annu Rev Biochem*, 2003.
- Bono, C., D. Nuzzo, G. Albeggiani, C. Zizzo, D. Francofonte, F. Iemolo, E. Sanzaro, and G. Duro. 'Genetic Screening of Fabry Patients with Ecotilling and Hrm Technology', *BMC Res Notes* **Vol. 4**, 323, 2011.
- Boscaro, F., G. Pieraccini, G. la Marca, G. Bartolucci, C. Luceri, F. Luceri, and G. Moneti. 'Rapid Quantitation of Globotriaosylceramide in Human Plasma and Urine: A Potential Application for Monitoring Enzyme Replacement Therapy in Anderson-Fabry Disease', *Rapid Commun Mass Spectrom* **Vol. 16, No. 16**, 1507-14, 2002.
- Brady, R. O. 'The Sphingolipidoses', *N Engl J Med* **Vol. 275, No. 6**, 312-8, 1966.
- Brady, R. O., J. N. Kanfer, M. B. Mock, and D. S. Fredrickson. 'The Metabolism of Sphingomyelin. Ii. Evidence of an Enzymatic Deficiency in Niemann-Pick Disease', *Proc Natl Acad Sci U S A* **Vol. 55, No. 2**, 366-9, 1966.
- Brady, R. O., J. N. Kanfer, and D. Shapiro. 'Metabolism of Glucocerebrosides. Ii. Evidence of an Enzymatic Deficiency in Gaucher's Disease', *Biochem Biophys Res Commun* **Vol. 18**, 221-5, 1965.
- Brady, R. O., P. G. Pentchev, A. E. Gal, S. R. Hibbert, and A. S. Dekaban. 'Replacement Therapy for Inherited Enzyme Deficiency. Use of Purified Glucocerebrosidase in Gaucher's Disease', *N Engl J Med* **Vol. 291, No. 19**, 989-93, 1974.
- Chamoles, N. A., M. Blanco, and D. Gaggioli. 'Fabry Disease: Enzymatic Diagnosis in Dried Blood Spots on Filter Paper', *Clin Chim Acta* **Vol. 308, No. 1-2**, 195-6, 2001.
- Charrow, J. 'A 14-Year-Old Boy with Pain in Hands and Feet', *Pediatr Ann* **Vol. 38, No. 4**, 190, 192, 2009.
- Chen, K., and N. Rajewsky. 'The Evolution of Gene Regulation by Transcription Factors and Micrnas', *Nat Rev Genet* **Vol. 8, No. 2**, 93-103, 2007.

- Cheng, X., and R. M. Blumenthal. 'Mammalian Dna Methyltransferases: A Structural Perspective', *Structure*, 2008.
- Cole, A. L., P. J. Lee, D. A. Hughes, P. B. Deegan, S. Waldek, and R. H. Lachmann. 'Depression in Adults with Fabry Disease: A Common and under-Diagnosed Problem', *J Inherit Metab Dis* **Vol. 30, No. 6**, 943-51, 2007.
- Cox, T., R. Lachmann, C. Hollak, J. Aerts, S. van Weely, M. Hrebicek, F. Platt, T. Butters, R. Dwek, C. Moyses, I. Gow, D. Elstein, and A. Zimran. 'Novel Oral Treatment of Gaucher's Disease with N-Butyldeoxynojirimycin (Ogt 918) to Decrease Substrate Biosynthesis', *Lancet*, 2000.
- DeGraba, T., S. Azhar, F. Dignat-George, E. Brown, B. Boutière, G. Altarescu, R. McCarron, and R. Schiffmann. 'Profile of Endothelial and Leukocyte Activation in Fabry Patients', *Ann Neurol* **Vol. 47, No. 2**, 229-33, 2000.
- Desnick, R., YA. Ioannou, and CM. Eng. 'Fabry Disease: A-Galactosidase a Deficiency', In C. Scriver, A. Beaudet, W. Sly and D. Valle (Eds.), *Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease* McGraw-Hill, 2001.
- Desnick, R. J., K. Y. Allen, S. J. Desnick, M. K. Raman, R. W. Bernlohr, and W. Krivit. 'Fabry's Disease: Enzymatic Diagnosis of Hemizygotes and Heterozygotes. Alpha-Galactosidase Activities in Plasma, Serum, Urine, and Leukocytes', *J Lab Clin Med*, 1973.
- Desnick, R. J., R. Brady, J. Barranger, A. J. Collins, D. P. Germain, M. Goldman, G. Grabowski, S. Packman, and W. R. Wilcox. 'Fabry Disease, an under-Recognized Multisystemic Disorder: Expert Recommendations for Diagnosis, Management, and Enzyme Replacement Therapy', *Ann Intern Med* **Vol. 138, No. 4**, 338-46, 2003.
- Dobrovolny, R., L. Dvorakova, J. Ledvinova, S. Magage, J. Bultas, J. C. Lubanda, M. Elleder, D. Karetova, M. Pavlikova, and M. Hrebicek. 'Relationship between X-Inactivation and Clinical Involvement in Fabry Heterozygotes. Eleven Novel Mutations in the Alpha-Galactosidase a Gene in the Czech and Slovak Population', *J Mol Med (Berl)* **Vol. 83, No. 8**, 647-54, 2005.
- Edwards, A., H. A. Hammond, L. Jin, C. T. Caskey, and R. Chakraborty. 'Genetic Variation at Five Trimeric and Tetrameric Tandem Repeat Loci in Four Human Population Groups', *Genomics* **Vol. 12, No. 2**, 241-53, 1992.
- Elliott, P. M., H. Kindler, J. S. Shah, B. Sachdev, O. E. Rimoldi, R. Thaman, M. T. Tome, W. J. McKenna, P. Lee, and P. G. Camici. 'Coronary Microvascular Dysfunction in Male Patients with Anderson-Fabry Disease and the Effect of Treatment with Alpha Galactosidase A', *Heart* **Vol. 92, No. 3**, 357-60, 2006.
- Elstein, D., E. Schachamorov, R. Beerli, and G. Altarescu. 'X-Inactivation in Fabry Disease', *Gene*, 2012 Elsevier B.V, 2012.
- Eng, C. M., D. P. Germain, M. Banikazemi, D. G. Warnock, C. Wanner, R. J. Hopkin, J. Bultas, P. Lee, K. Sims, S. E. Brodie, G. M. Pastores, J. M. Strotmann, and W. R. Wilcox. 'Fabry Disease: Guidelines for the Evaluation and Management of Multi-Organ System Involvement', *Genet Med* **Vol. 8, No. 9**, 539-48, 2006.
- Eng, C. M., N. Guffon, W. R. Wilcox, D. P. Germain, P. Lee, S. Waldek, L. Caplan, G. E. Linthorst, and R. J. Desnick. 'Safety and Efficacy of Recombinant Human Alpha-Galactosidase a--Replacement Therapy in Fabry's Disease', *N Engl J Med* **Vol. 345, No. 1**, 9-16, 2001.

- Eng, C. M., L. A. Resnick-Silverman, D. J. Niehaus, K. H. Astrin, and R. J. Desnick. 'Nature and Frequency of Mutations in the Alpha-Galactosidase a Gene That Cause Fabry Disease', *Am J Hum Genet* **Vol. 53, No. 6**, 1186-97, 1993.
- Fabry, J. 'Ein Beitrag Zur Kenntnis Der Purpura Haemorrhagica Nodularis (Purpura Papulosa Haemorrhagica Hebrae)', *Arch Dermatol Syph Band* **Vol. XL, No. 111**, 187-200, 1898.
- Fan, J. Q., and S. Ishii. 'Active-Site-Specific Chaperone Therapy for Fabry Disease. Yin and Yang of Enzyme Inhibitors', *Febs J*, 2007.
- Fan, J. Q., S. Ishii, N. Asano, and Y. Suzuki. 'Accelerated Transport and Maturation of Lysosomal Alpha-Galactosidase a in Fabry Lymphoblasts by an Enzyme Inhibitor', *Nat Med* **Vol. 5, No. 1**, 112-5, 1999.
- Fauler, G., G. N. Rechberger, D. Devrnja, W. Erwa, B. Plecko, P. Kotanko, F. Breunig, and E. Paschke. 'Rapid Determination of Urinary Globotriaosylceramide Isoform Profiles by Electrospray Ionization Mass Spectrometry Using Stearoyl-D35-Globotriaosylceramide as Internal Standard', *Rapid Commun Mass Spectrom* **Vol. 19, No. 11**, 1499-506, 2005.
- Feinberg, A. P. 'Phenotypic Plasticity and the Epigenetics of Human Disease', *Nature*, 2007.
- Feinberg, A. P., R. Ohlsson, and S. Henikoff. 'The Epigenetic Progenitor Origin of Human Cancer', *Nat Rev Genet*, 2006.
- Fellgiebel, A., M. J. Müller, and L. Ginsberg. 'Cns Manifestations of Fabry's Disease', *Lancet Neurol* **Vol. 5, No. 9**, 791-5, 2006.
- Ferri, L., C. Guido, G. la Marca, S. Malvagia, C. Cavicchi, A. Fiumara, R. Barone, R. Parini, D. Antuzzi, C. Feliciani, A. Zampetti, R. Manna, S. Giglio, C. M. Della Valle, X. Wu, K. J. Valenzano, R. Benjamin, M. A. Donati, R. Guerrini, M. Genuardi, and A. Morrone. 'Fabry Disease: Polymorphic Haplotypes and a Novel Missense Mutation in the Gla Gene', *Clin Genet* **Vol. 81, No. 3**, 224-33, 2012.
- Filoni, C., A. Caciotti, L. Carraresi, M. A. Donati, R. Mignani, R. Parini, M. Filocamo, F. Soliani, L. Simi, R. Guerrini, E. Zammarchi, and A. Morrone. 'Unbalanced Gla Mrnas Ratio Quantified by Real-Time Pcr in Fabry Patients' Fibroblasts Results in Fabry Disease', *Eur J Hum Genet* **Vol. 16, No. 11**, 1311-7, 2008.
- Fitzmaurice, T. F., R. J. Desnick, and D. F. Bishop. 'Human Alpha-Galactosidase A: High Plasma Activity Expressed by the -30g-->a Allele', *J Inherit Metab Dis* **Vol. 20, No. 5**, 643-57, 1997.
- Froissart, M., K. Benistan, and D. P. Germain. '[Functional Renal Investigation in Fabry Disease]', *Presse Med* **Vol. 36 Spec No 1**, 1S36-42, 2007.
- Froissart, R., N. Guffon, M. T. Vanier, R. J. Desnick, and I. Maire. 'Fabry Disease: D313y Is an Alpha-Galactosidase a Sequence Variant That Causes Pseudodeficient Activity in Plasma', *Mol Genet Metab*, 2003.
- Furness, P. N. 'Acp. Best Practice No 160. Renal Biopsy Specimens', *J Clin Pathol* **Vol. 53, No. 6**, 433-8, 2000.
- Gao, K., A. Masuda, T. Matsuura, and K. Ohno. 'Human Branch Point Consensus Sequence Is Yunay', *Nucleic Acids Res*, 2008.
- Garman, S. C. 'Structure-Function Relationships in Alpha-Galactosidase A', *Acta Paediatr Suppl* **Vol. 96, No. 455**, 6-16, 2007.

- Garman, S. C., and D. N. Garboczi. 'The Molecular Defect Leading to Fabry Disease: Structure of Human Alpha-Galactosidase', *J Mol Biol* **Vol. 337, No. 2**, 319-35, 2004.
- Germain, D. P. 'Fabry Disease', *Orphanet J Rare Dis* **Vol. 5**, 30, 2010.
- Germain, D. P., P. Avan, A. Chassaing, and P. Bonfils. 'Patients Affected with Fabry Disease Have an Increased Incidence of Progressive Hearing Loss and Sudden Deafness: An Investigation of Twenty-Two Hemizygous Male Patients', *BMC Med Genet* **Vol. 3**, 10, 2002.
- Germain, D. P., and J. Q. Fan. 'Pharmacological Chaperone Therapy by Active-Site-Specific Chaperones in Fabry Disease: In Vitro and Preclinical Studies', *Int J Clin Pharmacol Ther*, 2009.
- Germain, D. P., J. Shabbeer, S. Cotigny, and R. J. Desnick. 'Fabry Disease: Twenty Novel Alpha-Galactosidase a Mutations and Genotype-Phenotype Correlations in Classical and Variant Phenotypes', *Mol Med* **Vol. 8, No. 6**, 306-12, 2002.
- Gubler, M. C., G. Lenoir, J. P. Grünfeld, A. Ulmann, D. Droz, and R. Habib. 'Early Renal Changes in Hemizygous and Heterozygous Patients with Fabry's Disease', *Kidney Int* **Vol. 13, No. 3**, 223-35, 1978.
- Guce, A. I., N. E. Clark, E. N. Salgado, D. R. Ivanen, A. A. Kulminskaya, H. Brumer, and S. C. Garman. 'Catalytic Mechanism of Human Alpha-Galactosidase', *J Biol Chem* **Vol. 285, No. 6**, 3625-32, 2010.
- Guce, AL., and SC. Garman. 'The Structure of Human α -Galactosidase a and Implications for Fabry Disease', In D. Elstein, G. Altarescu and M. Beck (Eds.), *Fabry Disease*, Springer, 2010.
- Gupta, S. N., M. Ries, G. J. Murray, J. M. Quirk, R. O. Brady, J. R. Lidicker, R. Schiffmann, and D. F. Moore. 'Skin-Impedance in Fabry Disease: A Prospective, Controlled, Non-Randomized Clinical Study', *Bmc Neurol*, 2008.
- Handa, Y., S. Yotsumoto, E. Isobe, Y. Sai, N. Yoshii, S. Nakao, N. Fujita, S. Hamaguchi, and T. Kanzaki. 'A Case of Symptomatic Heterozygous Female Fabry's Disease without Detectable Mutation in the Alpha-Galactosidase Gene', *Dermatology*, 2000 S. Karger AG, Basel., 2000.
- Hannun, Y. A., and L. M. Obeid. 'Principles of Bioactive Lipid Signalling: Lessons from Sphingolipids', *Nat Rev Mol Cell Biol* **Vol. 9, No. 2**, 139-50, 2008.
- Hasegawa, H., H. Takano, S. Shindo, S. Takeda, N. Funabashi, K. Nakagawa, T. Toyozaki, Y. Kuwabara, and I. Komuro. 'Images in Cardiovascular Medicine. Transition from Left Ventricular Hypertrophy to Massive Fibrosis in the Cardiac Variant of Fabry Disease', *Circulation* **Vol. 113, No. 16**, e720-1, 2006.
- Herman, J. G., and S. B. Baylin. 'Gene Silencing in Cancer in Association with Promoter Hypermethylation', *N Engl J Med*, 2003.
- Hilz, M. J., B. Stemper, and E. H. Kolodny. 'Lower Limb Cold Exposure Induces Pain and Prolonged Small Fiber Dysfunction in Fabry Patients', *Pain* **Vol. 84, No. 2-3**, 361-5, 2000.
- Hoffmann, B., M. Beck, G. Sunder-Plassmann, W. Borsini, R. Ricci, and A. Mehta. 'Nature and Prevalence of Pain in Fabry Disease and Its Response to Enzyme Replacement Therapy--a Retrospective Analysis from the Fabry Outcome Survey', *Clin J Pain*, 2007.

- Holliday, R. 'Epigenetics: A Historical Overview', *Epigenetics*, 2006.
- Hong, C. S., B. Y. Park, and J. P. Saint-Jeannet. 'The Function of Dmrt Genes in Vertebrate Development: It Is Not Just About Sex', *Dev Biol* **Vol. 310**, **No. 1**, 1-9, 2007.
- Hopkin, R. J., J. Bissler, M. Banikazemi, L. Clarke, C. M. Eng, D. P. Germain, R. Lemay, A. Tylki-Szymanska, and W. R. Wilcox. 'Characterization of Fabry Disease in 352 Pediatric Patients in the Fabry Registry', *Pediatr Res* **Vol. 64**, **No. 5**, 550-5, 2008.
- Hwu, W. L., Y. H. Chien, N. C. Lee, S. C. Chiang, R. Dobrovolsky, A. C. Huang, H. Y. Yeh, M. C. Chao, S. J. Lin, T. Kitagawa, R. J. Desnick, and L. W. Hsu. '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* **Vol. 30**, **No. 10**, 1397-405, 2009.
- Ishii, S., H. H. Chang, K. Kawasaki, K. Yasuda, H. L. Wu, S. C. Garman, and J. Q. Fan. 'Mutant Alpha-Galactosidase a Enzymes Identified in Fabry Disease Patients with Residual Enzyme Activity: Biochemical Characterization and Restoration of Normal Intracellular Processing by 1-Deoxygalactonojirimycin', *Biochem J*, 2007.
- Ishii, S., S. Nakao, R. Minamikawa-Tachino, R. J. Desnick, and J. Q. Fan. 'Alternative Splicing in the Alpha-Galactosidase a Gene: Increased Exon Inclusion Results in the Fabry Cardiac Phenotype', *Am J Hum Genet* **Vol. 70**, **No. 4**, 994-1002, 2002.
- Iwakoshi, N. N., A. H. Lee, and L. H. Glimcher. 'The X-Box Binding Protein-1 Transcription Factor Is Required for Plasma Cell Differentiation and the Unfolded Protein Response', *Immunol Rev* **Vol. 194**, 29-38, 2003.
- Jeon, Y., K. Sarma, and J. T. Lee. 'New and Existing Regulatory Mechanisms of X Chromosome Inactivation', *Curr Opin Genet Dev*, 2012 Elsevier Ltd, 2012.
- Johnson, T. J., and L. K. Nolan. 'Pathogenomics of the Virulence Plasmids of Escherichia Coli', *Microbiol Mol Biol Rev* **Vol. 73**, **No. 4**, 750-74, 2009.
- Kacem, S., and R. Feil. 'Chromatin Mechanisms in Genomic Imprinting', *Mamm Genome* **Vol. 20**, **No. 9-10**, 544-56, 2009.
- Kanekura, T., T. Fukushige, A. Kanda, S. Tsuyama, F. Murata, H. Sakuraba, and T. Kanzaki. 'Immunoelectron-Microscopic Detection of Globotriaosylceramide Accumulated in the Skin of Patients with Fabry Disease', *Br J Dermatol* **Vol. 153**, **No. 3**, 544-8, 2005.
- Kang, W. H., S. I. Chun, and S. Lee. 'Generalized Anhidrosis Associated with Fabry's Disease', *J Am Acad Dermatol* **Vol. 17**, **No. 5 Pt 2**, 883-7, 1987.
- Keilmann, A., D. Hajioff, U. Ramaswami, and FOS Investigators. 'Ear Symptoms in Children with Fabry Disease: Data from the Fabry Outcome Survey', *J Inher Metab Dis* **Vol. 32**, **No. 6**, 739-44, 2009.
- Kornreich, R., and R. J. Desnick. 'Fabry Disease: Detection of Gene Rearrangements in the Human Alpha-Galactosidase a Gene by Multiplex Pcr Amplification', *Hum Mutat* **Vol. 2**, **No. 2**, 108-11, 1993.
- Kornreich, R., R. J. Desnick, and D. F. Bishop. 'Nucleotide Sequence of the Human Alpha-Galactosidase a Gene', *Nucleic Acids Res* **Vol. 17**, **No. 8**, 3301-2, 1989.
- Kouzarides, T. 'Chromatin Modifications and Their Function', *Cell*, 2007.

- Kuiper, G. G., P. W. Faber, H. C. van Rooij, J. A. van der Korput, C. Ris-Stalpers, P. Klaassen, J. Trapman, and A. O. Brinkmann. 'Structural Organization of the Human Androgen Receptor Gene', *J Mol Endocrinol* **Vol. 2, No. 3**, R1-4, 1989.
- Lai, L. W., O. Whitehair, M. J. Wu, M. O'Meara, and Y. H. Lien. 'Analysis of Splice-Site Mutations of the Alpha-Galactosidase a Gene in Fabry Disease', *Clin Genet* **Vol. 63, No. 6**, 476-82, 2003.
- Laney, D. A., D. J. Gruskin, P. M. Fernhoff, J. F. Cubells, O. Y. Ousley, H. Hipp, and A. J. Mehta. 'Social-Adaptive and Psychological Functioning of Patients Affected by Fabry Disease', *J Inherit Metab Dis*, 2010.
- Lee, K., X. Jin, K. Zhang, L. Copertino, L. Andrews, J. Baker-Malcolm, L. Geagan, H. Qiu, K. Seiger, D. Barngrover, J. M. McPherson, and T. Edmunds. 'A Biochemical and Pharmacological Comparison of Enzyme Replacement Therapies for the Glycolipid Storage Disorder Fabry Disease', *Glycobiology*, 2003.
- Linhart, A., T. Palecek, J. Bultas, J. J. Ferguson, J. Hrudová, D. Karetová, J. Zeman, J. Ledvinová, H. Poupětová, M. Elleder, and M. Aschermann. 'New Insights in Cardiac Structural Changes in Patients with Fabry's Disease', *Am Heart J* **Vol. 139, No. 6**, 1101-8, 2000.
- Linthorst, G. E., A. C. Vedder, J. M. Aerts, and C. E. Hollak. 'Screening for Fabry Disease Using Whole Blood Spots Fails to Identify One-Third of Female Carriers', *Clin Chim Acta*, 2005.
- Lopez, P. H., and R. L. Schnaar. 'Gangliosides in Cell Recognition and Membrane Protein Regulation', *Curr Opin Struct Biol* **Vol. 19, No. 5**, 549-57, 2009.
- Lu, J., C. Yang, M. Chen, D. Y. Ye, R. R. Lonser, R. O. Brady, and Z. Zhuang. 'Histone Deacetylase Inhibitors Prevent the Degradation and Restore the Activity of Glucocerebrosidase in Gaucher Disease', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011.
- Lyon, M. F. 'Gene Action in the X-Chromosome of the Mouse (*Mus Musculus L.*)', *Nature* **Vol. 190**, 372-3, 1961.
- Matlin, A. J., F. Clark, and C. W. Smith. 'Understanding Alternative Splicing: Towards a Cellular Code', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2005.
- Mayes, J. S., J. B. Scheerer, R. N. Sifers, and M. L. Donaldson. 'Differential Assay for Lysosomal Alpha-Galactosidases in Human Tissues and Its Application to Fabry's Disease', *Clin Chim Acta* **Vol. 112, No. 2**, 247-51, 1981.
- Mehta, A., R. Ricci, U. Widmer, F. Dehout, A. Garcia de Lorenzo, C. Kampmann, A. Linhart, G. Sunder-Plassmann, M. Ries, and M. Beck. 'Fabry Disease Defined: Baseline Clinical Manifestations of 366 Patients in the Fabry Outcome Survey', *Eur J Clin Invest* **Vol. 34, No. 3**, 236-42, 2004.
- Meikle, P. J., J. J. Hopwood, A. E. Clague, and W. F. Carey. 'Prevalence of Lysosomal Storage Disorders', *JAMA* **Vol. 281, No. 3**, 249-54, 1999.
- Meroni, M., A. Sessa, G. Battini, S. Tazzari, and L. Torri Tarelli. 'Kidney Involvement in Anderson-Fabry Disease', *Contrib Nephrol* **Vol. 122**, 178-84, 1997.
- Mills, K., S. Eaton, V. Ledger, E. Young, and B. Winchester. 'The Synthesis of Internal Standards for the Quantitative Determination of Sphingolipids by Tandem Mass Spectrometry', *Rapid Commun Mass Spectrom* **Vol. 19, No. 12**, 1739-48, 2005.

- Mills, K., A. Johnson, and B. Winchester. 'Synthesis of Novel Internal Standards for the Quantitative Determination of Plasma Ceramide Trihexoside in Fabry Disease by Tandem Mass Spectrometry', *Febs Lett*, 2002.
- Mills, K., A. Vellodi, P. Morris, D. Cooper, M. Morris, E. Young, and B. Winchester. 'Monitoring the Clinical and Biochemical Response to Enzyme Replacement Therapy in Three Children with Fabry Disease', *Eur J Pediatr* **Vol. 163, No. 10**, 595-603, 2004.
- Montgomery, J. L., L. N. Sanford, and C. T. Wittwer. 'High-Resolution Dna Melting Analysis in Clinical Research and Diagnostics', *Expert Rev Mol Diagn* **Vol. 10, No. 2**, 219-40, 2010.
- Moore, D. F., L. T. Scott, M. T. Gladwin, G. Altarescu, C. Kanaski, K. Suzuki, M. Pease-Fye, R. Ferri, R. O. Brady, P. Herscovitch, and R. Schiffmann. 'Regional Cerebral Hyperperfusion and Nitric Oxide Pathway Dysregulation in Fabry Disease: Reversal by Enzyme Replacement Therapy', *Circulation* **Vol. 104, No. 13**, 1506-12, 2001.
- Nakao, S., C. Kodama, T. Takenaka, A. Tanaka, Y. Yasumoto, A. Yoshida, T. Kanzaki, A. L. Enriquez, C. M. Eng, H. Tanaka, C. Tei, and R. J. Desnick. 'Fabry Disease: Detection of Undiagnosed Hemodialysis Patients and Identification of A "Renal Variant" Phenotype', *Kidney Int*, 2003.
- Nakao, S., T. Takenaka, M. Maeda, C. Kodama, A. Tanaka, M. Tahara, A. Yoshida, M. Kuriyama, H. Hayashibe, H. Sakuraba, and et al. 'An Atypical Variant of Fabry's Disease in Men with Left Ventricular Hypertrophy', *N Engl J Med* **Vol. 333, No. 5**, 288-93, 1995.
- Nataro, J. P., and J. B. Kaper. 'Diarrheagenic Escherichia Coli', *Clin Microbiol Rev* **Vol. 11, No. 1**, 142-201, 1998.
- Navarro, C., S. Teijeira, C. Dominguez, J. M. Fernandez, E. Rivas, C. Fachal, S. Barrera, C. Rodriguez, and P. Iranzo. 'Fabry Disease: An Ultrastructural Comparative Study of Skin in Hemizygous and Heterozygous Patients', *Acta Neuropathol* **Vol. 111, No. 2**, 178-85, 2006.
- Ohshima, T., G. J. Murray, W. D. Swaim, G. Longenecker, J. M. Quirk, C. O. Cardarelli, Y. Sugimoto, I. Pastan, M. M. Gottesman, R. O. Brady, and A. B. Kulkarni. 'Alpha-Galactosidase a Deficient Mice: A Model of Fabry Disease', *Proc Natl Acad Sci U S A* **Vol. 94, No. 6**, 2540-4, 1997.
- Okumiya, T., S. Ishii, T. Takenaka, R. Kase, S. Kamei, H. Sakuraba, and Y. Suzuki. 'Galactose Stabilizes Various Missense Mutants of Alpha-Galactosidase in Fabry Disease', *Biochem Biophys Res Commun*, 1995.
- Oliveira, J. P., S. Ferreira, J. Barcelo, P. Gaspar, F. Carvalho, M. C. Sa Miranda, and J. E. Mansson. 'Effect of Single-Nucleotide Polymorphisms of the 5' Untranslated Region of the Human Alpha-Galactosidase Gene on Enzyme Activity, and Their Frequencies in Portuguese Caucasians', *J Inherit Metab Dis* **Vol. 31 Suppl 2**, S247-53, 2008.
- Oliveira, J. P., S. Ferreira, C. Reguenga, F. Carvalho, and J. E. Mansson. 'The G.1170c>T Polymorphism of the 5' Untranslated Region of the Human Alpha-Galactosidase Gene Is Associated with Decreased Enzyme Expression--Evidence from a Family Study', *J Inherit Metab Dis* **Vol. 31 Suppl 2**, S405-13, 2008.
- Olivova, P., K. van der Veen, E. Cullen, M. Rose, X. K. Zhang, K. B. Sims, J. Keutzer, and M. F. Browning. 'Effect of Sample Collection on Alpha-

- Galactosidase a Enzyme Activity Measurements in Dried Blood Spots on Filter Paper', *Clin Chim Acta*, 2009.
- Orssaud, C., J. Dufier, and D. Germain. 'Ocular Manifestations in Fabry Disease: A Survey of 32 Hemizygous Male Patients', *Ophthalmic Genet* **Vol. 24, No. 3**, 129-39, 2003.
- Orteu, C. H., T. Jansen, O. Lidove, R. Jaussaud, D. A. Hughes, G. Pintos-Morell, U. Ramaswami, R. Parini, G. Sunder-Plassman, M. Beck, and A. B. Mehta. 'Fabry Disease and the Skin: Data from Fos, the Fabry Outcome Survey', *Br J Dermatol*, 2007.
- Palla, A., S. Hegemann, U. Widmer, and D. Straumann. 'Vestibular and Auditory Deficits in Fabry Disease and Their Response to Enzyme Replacement Therapy', *J Neurol* **Vol. 254, No. 10**, 1433-42, 2007.
- Patrakka, J., and K. Tryggvason. 'Molecular Make-up of the Glomerular Filtration Barrier', *Biochem Biophys Res Commun* **Vol. 396, No. 1**, 164-9, 2010.
- Payer, B., and J. T. Lee. 'X Chromosome Dosage Compensation: How Mammals Keep the Balance', *Annu Rev Genet* **Vol. 42**, 733-72, 2008.
- Pfaffl, MW. 'Relative Quantification', In T. Dorak (Ed.), *Real-Time Pcr*, International University Line, 2006.
- Pisani, A., M. Imbriaco, C. Zizzo, G. Albeggiani, P. Colomba, R. Alessandro, F. Iemolo, and G. Duro. 'A Classical Phenotype of Anderson-Fabry Disease in a Female Patient with Intronic Mutations of the *Gla* Gene: A Case Report', *BMC Cardiovasc Disord* **Vol. 12**, 39, 2012.
- Pompen, A. W., M. Ruiter, and H. J. Wyers. 'Angiokeratoma Corporis Diffusum (Universale) Fabry, as a Sign of an Unknown Internal Disease; Two Autopsy Reports', *Acta Med Scand* **Vol. 128, No. 3**, 234-55, 1947.
- Poorthuis, B. J., R. A. Wevers, W. J. Kleijer, J. E. Groener, J. G. de Jong, S. van Weely, K. E. Niezen-Koning, and O. P. van Diggelen. 'The Frequency of Lysosomal Storage Diseases in the Netherlands', *Hum Genet* **Vol. 105, No. 1-2**, 151-6, 1999.
- Rakyan, V. K., and S. Beck. 'Epigenetic Variation and Inheritance in Mammals', *Curr Opin Genet Dev*, 2006.
- Redonnet-Vernhet, I., J. K. Ploos van Amstel, R. P. Jansen, R. A. Wevers, R. Salvayre, and T. Levade. 'Uneven X Inactivation in a Female Monozygotic Twin Pair with Fabry Disease and Discordant Expression of a Novel Mutation in the Alpha-Galactosidase a Gene', *J Med Genet* **Vol. 33, No. 8**, 682-8, 1996.
- Ries, M., H. J. Kim, C. K. Zalewski, M. A. Mastroianni, D. F. Moore, R. O. Brady, J. M. Dambrosia, R. Schiffmann, and C. C. Brewer. 'Neuropathic and Cerebrovascular Correlates of Hearing Loss in Fabry Disease', *Brain* **Vol. 130, No. Pt 1**, 143-50, 2007.
- Robertson, K. D., and A. P. Wolffe. 'Dna Methylation in Health and Disease', *Nat Rev Genet* **Vol. 1, No. 1**, 11-9, 2000.
- Rolke, R., R. Baron, C. Maier, T. R. Tolle, R. D. Treede, A. Beyer, A. Binder, N. Birbaumer, F. Birklein, I. C. Botefur, S. Braune, H. Flor, V. Hugel, R. Klug, G. B. Landwehrmeyer, W. Magerl, C. Maihofner, C. Rolko, C. Schaub, A. Scherens, T. Sprenger, M. Valet, and B. Wasserka. 'Quantitative Sensory Testing in the German Research Network on Neuropathic Pain (Dfns):

- Standardized Protocol and Reference Values', *Pain* **Vol. 123, No. 3**, 231-43, 2006.
- Rombach, S. M., N. Dekker, M. G. Bouwman, G. E. Linthorst, A. H. Zwinderman, F. A. Wijburg, S. Kuiper, M. A. Vd Bergh Weerman, J. E. Groener, B. J. Poorthuis, C. E. Hollak, and J. M. Aerts. 'Plasma Globotriaosylsphingosine: Diagnostic Value and Relation to Clinical Manifestations of Fabry Disease', *Biochim Biophys Acta*, 2010 Elsevier B.V, 2010.
- Rosenberg, D. M., V. J. Ferrans, J. D. Fulmer, B. R. Line, J. A. Barranger, R. O. Brady, and R. G. Crystal. 'Chronic Airflow Obstruction in Fabry's Disease', *Am J Med* **Vol. 68, No. 6**, 898-905, 1980.
- Rozenfeld, P. A., N. P. De Francesco, G. J. Borrajo, R. Ceci, and C. A. Fossati. 'An Easy and Sensitive Method for Determination of Globotriaosylceramide (Gb3) from Urinary Sediment: Utility for Fabry Disease Diagnosis and Treatment Monitoring', *Clin Chim Acta*, 2009.
- Sadek, J., R. Shellhaas, C. S. Camfield, P. R. Camfield, and J. Burley. 'Psychiatric Findings in Four Female Carriers of Fabry Disease', *Psychiatr Genet* **Vol. 14, No. 4**, 199-201, 2004.
- Sadowski, C. L., R. W. Henry, R. Kobayashi, and N. Hernandez. 'The Snap45 Subunit of the Small Nuclear Rna (Snrna) Activating Protein Complex Is Required for Rna Polymerase Ii and Iii Snrna Gene Transcription and Interacts with the Tata Box Binding Protein', *Proc Natl Acad Sci U S A* **Vol. 93, No. 9**, 4289-93, 1996.
- Sakuraba, H., M. Murata-Ohsawa, I. Kawashima, Y. Tajima, M. Kotani, T. Ohshima, Y. Chiba, M. Takashiba, Y. Jigami, T. Fukushige, T. Kanzaki, and K. Itoh. 'Comparison of the Effects of Agalsidase Alfa and Agalsidase Beta on Cultured Human Fabry Fibroblasts and Fabry Mice', *J Hum Genet* **Vol. 51, No. 3**, 180-8, 2006.
- Sammeth, M., S. Foissac, and R. Guigo. 'A General Definition and Nomenclature for Alternative Splicing Events', *PLoS Comput Biol* **Vol. 4, No. 8**, e1000147, 2008.
- Sanchez-Niño, M. D., A. B. Sanz, S. Carrasco, M. A. Saleem, P. W. Mathieson, J. M. Valdivielso, M. Ruiz-Ortega, J. Egido, and A. Ortiz. 'Globotriaosylsphingosine Actions on Human Glomerular Podocytes: Implications for Fabry Nephropathy', *Nephrol Dial Transplant* **Vol. 26, No. 6**, 1797-802, 2011.
- Schenkel-Brunner, H. 'Human Blood Groups', *Chemical and Biochemical Basis Of antigen Specificity* Springer, 2000.
- Schiffmann, R., J. B. Kopp, H. A. Austin, 3rd, S. Sabnis, D. F. Moore, T. Weibel, J. E. Balow, and R. O. Brady. 'Enzyme Replacement Therapy in Fabry Disease: A Randomized Controlled Trial', *Jama*, 2001.
- Schiffmann, R., M. Ries, M. Timmons, J. T. Flaherty, and R. O. Brady. 'Long-Term Therapy with Agalsidase Alfa for Fabry Disease: Safety and Effects on Renal Function in a Home Infusion Setting', *Nephrol Dial Transplant*, 2006.
- Schiffmann, R., D. G. Warnock, M. Banikazemi, J. Bultas, G. E. Linthorst, S. Packman, S. A. Sorensen, W. R. Wilcox, and R. J. Desnick. 'Fabry Disease: Progression of Nephropathy, and Prevalence of Cardiac and Cerebrovascular Events before Enzyme Replacement Therapy', *Nephrol Dial Transplant* **Vol. 24, No. 7**, 2102-11, 2009.

- Schirinzi, A., M. Centra, C. Prattichizzo, M. Gigante, M. De Fabritiis, V. Giancaspro, F. Petrarulo, R. Santacroce, M. Margaglione, L. Gesualdo, and E. Ranieri. 'Identification of Gla Gene Deletions in Fabry Patients by Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification (Mlpa)', *Mol Genet Metab*, 2008.
- Schleicher, E., V. Kolm, M. Ceol, and A. Nerlich. 'Structural and Functional Changes in Diabetic Glomerulopathy', *Kidney Blood Press Res* **Vol. 19, No. 5**, 305-15, 1996.
- Schmidt-Kuntzel, A., G. Nelson, V. A. David, A. A. Schaffer, E. Eizirik, M. E. Roelke, J. S. Kehler, S. S. Hannah, S. J. O'Brien, and M. Menotti-Raymond. 'A Domestic Cat X Chromosome Linkage Map and the Sex-Linked Orange Locus: Mapping of Orange, Multiple Origins and Epistasis over Nonagouti', *Genetics*, 2009.
- Segal, P., Y. Kohn, Y. Pollak, G. Altarescu, E. Galili-Weisstub, and A. Raas-Rothschild. 'Psychiatric and Cognitive Profile in Anderson-Fabry Patients: A Preliminary Study', *J Inherit Metab Dis* **Vol. 33, No. 4**, 429-36, 2010.
- Shabbeer, J., M. Yasuda, E. Luca, and R. J. Desnick. 'Fabry Disease: 45 Novel Mutations in the Alpha-Galactosidase a Gene Causing the Classical Phenotype', *Mol Genet Metab* **Vol. 76, No. 1**, 23-30, 2002.
- Shelley, E. D., W. B. Shelley, and T. W. Kurczynski. 'Painful Fingers, Heat Intolerance, and Telangiectases of the Ear: Easily Ignored Childhood Signs of Fabry Disease', *Pediatr Dermatol* **Vol. 12, No. 3**, 215-9, 1995.
- Sheth, K. J., and J. P. Thomas. 'Electrocardiograms in Fabry's Disease', *J Electrocardiol* **Vol. 15, No. 2**, 153-6, 1982.
- Sheth, K. J., S. L. Werlin, M. E. Freeman, and A. E. Hodach. 'Gastrointestinal Structure and Function in Fabry's Disease', *Am J Gastroenterol* **Vol. 76, No. 3**, 246-51, 1981.
- Sims, K., J. Politei, M. Banikazemi, and P. Lee. 'Stroke in Fabry Disease Frequently Occurs before Diagnosis and in the Absence of Other Clinical Events: Natural History Data from the Fabry Registry', *Stroke* **Vol. 40, No. 3**, 788-94, 2009.
- Spada, M., S. Pagliardini, M. Yasuda, T. Tukul, G. Thiagarajan, H. Sakuraba, A. Ponzzone, and R. J. Desnick. 'High Incidence of Later-Onset Fabry Disease Revealed by Newborn Screening', *Am J Hum Genet* **Vol. 79, No. 1**, 31-40, 2006.
- Stancevic, B., and R. Kolesnick. 'Ceramide-Rich Platforms in Transmembrane Signaling', *FEBS Lett* **Vol. 584, No. 9**, 1728-40, 2010.
- Stenson, P. D., E. V. Ball, M. Mort, A. D. Phillips, J. A. Shiel, N. S. Thomas, S. Abeyasinghe, M. Krawczak, and D. N. Cooper. 'Human Gene Mutation Database (Hgmdb): 2003 Update', *Hum Mutat* **Vol. 21, No. 6**, 577-81, 2003.
- Sugawara, K., Y. Tajima, I. Kawashima, T. Tsukimura, S. Saito, K. Ohno, K. Iwamoto, T. Kobayashi, K. Itoh, and H. Sakuraba. 'Molecular Interaction of Imino Sugars with Human Alpha-Galactosidase: Insight into the Mechanism of Complex Formation and Pharmacological Chaperone Action in Fabry Disease', *Mol Genet Metab* **Vol. 96, No. 4**, 233-8, 2009.
- Sweeley, C. C., and B. Klionsky. 'Fabry's Disease: Classification as a Sphingolipidosis and Partial Characterization of a Novel Glycolipid', *J Biol Chem* **Vol. 238**, 3148-50, 1963.

- Takenaka, T., H. Teraguchi, A. Yoshida, S. Taguchi, K. Ninomiya, Y. Umekita, H. Yoshida, M. Horinouchi, K. Tabata, S. Yonezawa, M. Yoshimitsu, K. Higuchi, S. Nakao, R. Anan, S. Minagoe, and C. Tei. 'Terminal Stage Cardiac Findings in Patients with Cardiac Fabry Disease: An Electrocardiographic, Echocardiographic, and Autopsy Study', *J Cardiol* **Vol. 51, No. 1**, 50-9, 2008.
- Tanislav, C., M. Kaps, A. Rolfs, T. Bottcher, K. Lackner, E. Paschke, H. Mascher, M. Laue, and F. Blaes. 'Frequency of Fabry Disease in Patients with Small-Fibre Neuropathy of Unknown Aetiology: A Pilot Study', *Eur J Neurol* **Vol. 18, No. 4**, 631-6, 2011.
- Tatara, Y., M. Ohishi, K. Yamamoto, A. Shiota, N. Hayashi, Y. Iwamoto, M. Takeda, T. Takagi, T. Katsuya, T. Ogihara, and H. Rakugi. 'Macrophage Inflammatory Protein-1beta Induced Cell Adhesion with Increased Intracellular Reactive Oxygen Species', *J Mol Cell Cardiol* **Vol. 47, No. 1**, 104-11, 2009.
- Tilley, W. D., M. Marcelli, J. D. Wilson, and M. J. McPhaul. 'Characterization and Expression of a Cdna Encoding the Human Androgen Receptor', *Proc Natl Acad Sci U S A* **Vol. 86, No. 1**, 327-31, 1989.
- Topaloglu, A. K., G. A. Ashley, B. Tong, J. Shabbeer, K. H. Astrin, C. M. Eng, and R. J. Desnick. 'Twenty Novel Mutations in the Alpha-Galactosidase a Gene Causing Fabry Disease', *Mol Med* **Vol. 5, No. 12**, 806-11, 1999.
- Touboul, D., S. Roy, D. P. Germain, A. Baillet, F. Brion, P. Prognon, P. Chaminade, and O. Laprévotte. 'Fast Fingerprinting by Maldi-Tof Mass Spectrometry of Urinary Sediment Glycosphingolipids in Fabry Disease', *Anal Bioanal Chem* **Vol. 382, No. 5**, 1209-16, 2005.
- Uchida, T., H. Ohashi, E. Aoki, Y. Nakahara, T. Hotta, T. Murate, H. Saito, and T. Kinoshita. 'Clonality Analysis by Methylation-Specific Pcr for the Human Androgen-Receptor Gene (Humara-Msp)', *Leukemia* **Vol. 14, No. 1**, 207-12, 2000.
- Umlauf, D., P. Fraser, and T. Nagano. 'The Role of Long Non-Coding Rnas in Chromatin Structure and Gene Regulation: Variations on a Theme', *Biol Chem* **Vol. 389, No. 4**, 323-31, 2008.
- Valbuena, C., E. Carvalho, M. Bustorff, M. Ganhao, S. Relvas, R. Nogueira, F. Carneiro, and J. P. Oliveira. 'Kidney Biopsy Findings in Heterozygous Fabry Disease Females with Early Nephropathy', *Virchows Arch* **Vol. 453, No. 4**, 329-38, 2008.
- van Breemen, M. J., M. de Fost, J. S. Voerman, J. D. Laman, R. G. Boot, M. Maas, C. E. Hollak, J. M. Aerts, and F. Rezaee. 'Increased Plasma Macrophage Inflammatory Protein (Mip)-1alpha and Mip-1beta Levels in Type 1 Gaucher Disease', *Biochim Biophys Acta* **Vol. 1772, No. 7**, 788-96, 2007.
- van der Feltz, C., K. Anthony, A. Brilot, and D. A. Pomeranz Krummel. 'Architecture of the Spliceosome', *Biochemistry*, 2012.
- Vedder, A. C., J. Cox-Brinkman, C. E. Hollak, G. E. Linthorst, J. E. Groener, M. T. Helmond, S. Scheij, and J. M. Aerts. 'Plasma Chitotriosidase in Male Fabry Patients: A Marker for Monitoring Lipid-Laden Macrophages and Their Correction by Enzyme Replacement Therapy', *Mol Genet Metab* **Vol. 89, No. 3**, 239-44, 2006.
- Waddington, C. H. 'The Epigenotype. 1942', *Int J Epidemiol*, 2012.

- Walker, P. D., T. Cavallo, and S. M. Bonsib. 'Practice Guidelines for the Renal Biopsy', *Mod Pathol* **Vol. 17, No. 12**, 1555-63, 2004.
- Wang, J., J. Lozier, G. Johnson, S. Kirshner, D. Verthelyi, A. Pariser, E. Shores, and A. Rosenberg. 'Neutralizing Antibodies to Therapeutic Enzymes: Considerations for Testing, Prevention and Treatment', *Nat Biotechnol*, 2008.
- Wherrett, J. R., and S. I. Hakomori. 'Characterization of a Blood Group B Glycolipid, Accumulating in the Pancreas of a Patient with Fabry's Disease', *J Biol Chem* **Vol. 248, No. 9**, 3046-51, 1973.
- Whitelaw, N. C., and E. Whitelaw. 'How Lifetimes Shape Epigenotype within and across Generations', *Hum Mol Genet*, 2006.
- Whitfield, P. D., J. Calvin, S. Hogg, E. O'Driscoll, D. Halsall, K. Burling, G. Maguire, N. Wright, T. M. Cox, P. J. Meikle, and P. B. Deegan. 'Monitoring Enzyme Replacement Therapy in Fabry Disease--Role of Urine Globotriaosylceramide', *J Inherit Metab Dis* **Vol. 28, No. 1**, 21-33, 2005.
- Whittier, W. L., and S. M. Korbet. 'Renal Biopsy: Update', *Curr Opin Nephrol Hypertens* **Vol. 13, No. 6**, 661-5, 2004.
- Winchester, B., and E. Young. 'Biochemical and Genetic Diagnosis of Fabry Disease', In A. Mehta, M. Beck and G. Sunder-Plassmann (Eds.), *Fabry Disease: Perspectives from 5 Years Offos*, Pharmagenesis, 2006.
- Wiseman, D. A., R. Hawkins, L. M. Numerow, and K. J. Taub. 'Percutaneous Renal Biopsy Utilizing Real Time, Ultrasonic Guidance and a Semiautomated Biopsy Device', *Kidney Int* **Vol. 38, No. 2**, 347-9, 1990.
- Yam, G. H., N. Bosshard, C. Zuber, B. Steinmann, and J. Roth. 'Pharmacological Chaperone Corrects Lysosomal Storage in Fabry Disease Caused by Trafficking-Incompetent Variants', *Am J Physiol Cell Physiol*, 2006.
- Yam, G. H., C. Zuber, and J. Roth. 'A Synthetic Chaperone Corrects the Trafficking Defect and Disease Phenotype in a Protein Misfolding Disorder', *Faseb J*, 2005.
- Yasuda, M., J. Shabbeer, S. D. Benson, I. Maire, R. M. Burnett, and R. J. Desnick. 'Fabry Disease: Characterization of Alpha-Galactosidase a Double Mutations and the D313y Plasma Enzyme Pseudodeficiency Allele', *Hum Mutat* **Vol. 22, No. 6**, 486-92, 2003.
- Yu, R. K., Y. Nakatani, and M. Yanagisawa. 'The Role of Glycosphingolipid Metabolism in the Developing Brain', *J Lipid Res* **Vol. 50 Suppl**, S440-5, 2009.
- Zhang, X. K., C. S. Elbin, W. L. Chuang, S. K. Cooper, C. A. Marashio, C. Beauregard, and J. M. Keutzer. 'Multiplex Enzyme Assay Screening of Dried Blood Spots for Lysosomal Storage Disorders by Using Tandem Mass Spectrometry', *Clin Chem*, 2008.

