



# **Estudio de las bases moleculares de la fibrosis quística y la enfermedad de Sandhoff. Ensayos *in vitro* en modelos de mutaciones intrónicas del gen *HEXB***

**Julia Mugnaini.**

Tesis - Doctor en Ciencias de la Salud - Universidad Nacional de Córdoba. Facultad de Ciencias Médicas. Secretaría de Graduados en Ciencias de la Salud, 2018

Aprobada: Agosto 2018

---

Este documento está disponible para su consulta y descarga en RDU (Repositorio Digital de la Universidad Nacional de Córdoba). El mismo almacena, organiza, preserva, provee acceso libre y da visibilidad a nivel nacional e internacional a la producción científica, académica y cultural en formato digital, generada por los miembros de la Universidad Nacional de Córdoba. Para más información, visite el sitio <https://rdu.unc.edu.ar/>

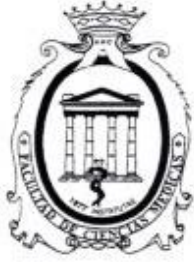
Esta iniciativa está a cargo de la OCA (Oficina de Conocimiento Abierto), conjuntamente con la colaboración de la Prosecretaría de Informática de la Universidad Nacional de Córdoba y los Nodos OCA. Para más información, visite el sitio <http://oca.unc.edu.ar/>

---

Esta obra se encuentra protegida por una Licencia Creative Commons 4.0 Internacional



Estudio de las bases moleculares de la fibrosis quística y la enfermedad de Sandhoff . Ensayos *in vitro* en modelos de mutaciones intrónicas del gen *HEXB* por Julia Mugnaini se distribuye bajo una [Licencia Creative Commons Atribución – No Comercial – Sin Obra Derivada 4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/)..



**Universidad Nacional de Córdoba**  
**Facultad de Ciencias Médicas**



*Tesis Doctoral*

**ESTUDIO DE LAS BASES MOLECULARES DE LA FIBROSIS QUÍSTICA Y  
LA ENFERMEDAD DE SANDHOFF. ENSAYOS *IN VITRO* EN MODELOS DE  
MUTACIONES INTRÓNICAS DEL GEN *HEXB***

*Licenciada Julia Mugnaini*

Centro de Estudio de las Metabolopatías Congénitas - CEMECO

Hospital de Niños de la Santísima Trinidad

Cátedra de Clínica Pediátrica - Facultad de Ciencias Médicas

Universidad Nacional de Córdoba

2018

DIRECTORA

Dra. Ana María Oller de Ramírez

CO-DIRECTOR

Dr. Carlos Enrique Argaraña

INTEGRANTES DE LA COMISIÓN DE SEGUIMIENTO DE TESIS

Dra. Beatriz García

Dra. Laura Moreno

ARTÍCULO N°28 DEL REGLAMENTO DE LA CARRERA DE DOCTORADO EN  
CIENCIAS DE LA SALUD

“La Facultad de Ciencias Médicas no se hace solidaria con las opiniones de  
esta Tesis”

## ***Agradecimientos***

En primer lugar quiero agradecer a mi familia. A mis padres, por su apoyo incondicional y ejemplo. A mis hermanos, por estar presentes, alegrándose y acompañándome en cada uno de mis logros. A Matias, por su compañía y apoyo de siempre, en las buenas y en las malas. A mi tío Gusti y a mis abuelos Norita y Víctor, siempre presentes.

A la Dra. Ana María Oller de Ramírez, por darme la oportunidad de incursionar en la investigación clínica. Por dejarme intentar, aprender, discutir y por permitirme iniciar este camino desde mi tesina de licenciatura.

Al Dr. Carlos Argaraña, por su apoyo incondicional, su buena predisposición de siempre y su gran generosidad.

A la Dra. Raquel Dodelson de Kremer, por abrirme las puertas de CEMECO, por permitir formarme y crecer en tan prestigiosa institución.

A los miembros de la Comisión de Seguimiento de Tesis, Prof. Dra. Laura Moreno y Prof. Dra. Beatriz Garcia, por sus valiosos aportes durante la realización de este trabajo.

A la M.Sc Nydia Azar, por su apoyo incondicional, por sus consejos y su cariño desinteresado. Por su amistad y por su gran corazón de mamá.

A todos mis compañeros de trabajo en CEMECO de hoy y de siempre: Adri B., Adri F., Ali, Ana Julia, Andre, Bea, Beto, Carla, Carola, Celia, Dora, Elena, Fabio, Fer S., Fer P, Inés, Laura, Leila, Lore, Lourdes, Miriam, Richard, Romi, Sandri, Silvina, Vicenta y Ale del laboratorio de citogenética. Por todo lo compartido durante tantos años, por integrarme y hacerme sentir una más.

A las médicas de los Servicios de Neumonología y Gastroenterología del Hospital de Niños: Dra. Inés Marqués, Dra. Laura Moreno, Dra. Verónica Petri, Dra. Elizabeth Bujedo, Dra. Verónica Kohn, Dra. Gisela Arato, Dra. Fanny Arroyo. Por su asesoramiento en la parte clínica de esta Tesis.

A la Dra. Belén Pérez González, Dra. Lourdes Desviat y Dra. Magdalena Ugarte del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, Universidad Autónoma

de Madrid, por recibirme cordialmente, aconsejarme y permitirme realizar parte de los experimentos de esta Tesis en su laboratorio. A mis compañeros de laboratorio en Madrid: Ainhoa, Álvaro, Alejandra, Alejandro, Alfonso, Ana, Eva, Irene, Pachu, Pepa, y especialmente a Nooshin y Sandra, que me hicieron sentir como en mi propia casa.

A la Dra. Caroline Raynal y Dra. Mireille Claustres del Institut Universitaire de Recherche Clinique en Montpellier, Francia, por abrirme las puertas de su laboratorio y permitirme realizar parte de este trabajo de Tesis.

A Susana y Gabi, del laboratorio de cultivo celular del Centro de Investigaciones en Química Biológica, por su ayuda y generosidad.

A Julia, Susana, Dora, Nati, Soledad, Romi, Fabi, Sabri, Magui, de la Cátedra de Biología Celular "B", Facultad de Odontología, Universidad Nacional de Córdoba, por introducirme en el mundo de la docencia universitaria. Por sus consejos, apoyo y compañía en esta etapa.

A mis grandes amigas que me regaló esta etapa. A Cyn, mi concubina, chef preferida y potencial QFS, por aprender juntas, por estar siempre. A Sile, mi gran ejemplo a seguir, por tu gran generosidad, tu palabra justa. A Lore, mi compañera de locuras y de tenis, por tu espontaneidad, por los lindos momentos con nuestra música. A Magui, mi bioquímica preferida, por tu gran dulzura, por tener siempre la mejor predisposición para ayudar. Gracias a todas por su gran cariño, compañerismo y amistad incondicional!

A Vero, Seba, Jessi y Valen, hermoso grupo de amigos que me llevo del doctorado, por estar presentes, por la sinceridad fatal y risas interminables.

A Vero, Luchi y Euge por su amistad incondicional, aún desde la distancia.

A Conner, por ayudarme con el inglés, por su amistad y apoyo.

A Victoria, por su amistad, consejos, por su amor por el oficio inspirador.

A todos los que formaron parte de este camino y a todos los que me acompañan en el presente en la nueva etapa por iniciar. Gracias!!

## INDICE GENERAL

INDICE GENERAL	6
INDICE DE TABLAS	12
INDICE DE FIGURAS	14
RESUMEN	16
ABSTRACT	18
ABREVIATURAS	20
PRÓLOGO	23
1 INTRODUCCIÓN	24
1.1 FIBROSIS QUÍSTICA	24
1.1.1 Proteína CFTR	24
1.1.2 Manifestaciones clínicas en la fibrosis quística	27
1.1.3 Incidencia de la fibrosis quística	29
1.1.4 Gen CFTR y mutaciones causantes de fibrosis quística	29
1.1.5 Correlación genotipo-fenotipo	31
1.1.6 Diagnóstico de la fibrosis quística	33
1.1.7 Resultados previos en CEMECO y en otros centros de Argentina	34
1.1.8 Opciones terapéuticas para la fibrosis quística	36
1.2 ENFERMEDAD DE SANDHOFF	38
1.2.1 Enfermedades lisosomales y Gangliosidosis GM2	38
1.2.1.1 El gangliósido GM2	38
1.2.1.2 Complejo lisosomal de las Hexosaminidasas	40
1.2.1.3 Variantes enzimáticas	40
1.2.2 Manifestaciones clínicas en la enfermedad de Sandhoff	42
1.2.3 Incidencia de la enfermedad de Sandhoff	44
1.2.4 Gen HEXB y mutaciones causantes de enfermedad de Sandhoff	45
1.2.5 Diagnóstico de la enfermedad de Sandhoff	46
1.2.6 Resultados previos en CEMECO	47

1.2.7	Perspectivas terapéuticas para las Enfermedades de almacenamiento lisosomal y la enfermedad de Sandhoff	51
1.3	ENSAYOS <i>IN VITRO</i>	53
1.3.1	El uso de minigenes como modelos funcionales	53
1.3.2	Tratamiento con variantes de ribonucleoproteínas U1	54
1.4	OBJETIVOS DE ESTE TRABAJO DE TESIS	56
2	MATERIALES Y MÉTODOS	57
2.1	Principios éticos	57
2.2	Diagnóstico molecular de la fibrosis quística	57
2.2.1	Sujetos	57
2.2.2	Estrategia diagnóstica	59
2.2.2.1	Extracción de ADN	61
2.2.2.2	Diseño de oligonucleótidos	61
2.2.2.3	Amplificación génica	63
2.2.2.4	Purificación y secuenciación de los productos amplificados	63
2.2.2.5	Análisis predictivo computacional para variantes génicas con efecto fenotípico desconocido	63
2.3	Diagnóstico bioquímico y molecular de la enfermedad de Sandhoff	65
2.3.1	Sujetos	65
2.3.2	Estrategia diagnóstica	67
2.3.2.1	Determinación de la actividad Hexosaminidasa	68
2.3.2.2	Extracción de ADN	69
2.3.2.3	Estudio de la mutación más frecuente c.445+1G>A	70
2.3.2.4	Diseño de cebadores	70
2.3.2.5	Amplificación génica	70
2.3.2.6	Purificación y secuenciación de los productos amplificados	71
2.4	Investigación de mutaciones causantes de enfermedad de Sandhoff en la población de Traslasierra de Córdoba	71



2.4.1	Material biológico	72
2.4.2	Investigación de mutaciones	73
2.4.3	Ensayos de restricción enzimática	73
2.4.4	Amplificación y secuenciación de exones específicos del gen HEXB	74
2.5	Análisis fenotípico de mutaciones intrónicas en el gen <i>HEXB</i> mediante expresión de minigenes en células eucariotas en cultivo	74
2.5.1	Obtención de minigenes	75
2.5.1.1	Amplificación por PCR	75
2.5.1.2	Clonación en vector pGEM-T	75
2.5.1.3	Transformación de cepas de <i>Escherichia coli</i>	75
2.5.1.4	Purificación de plásmidos	76
2.5.1.5	Digestión enzimática	76
2.5.1.6	Desfosforilación vector pSPL3	76
2.5.1.7	Unión inserto-vector	76
2.5.1.8	Secuenciación	76
2.5.1.9	Mutagénesis dirigida	77
2.5.2	Análisis funcional in vitro de las mutaciones intrónicas c.445+1G>A y c.1509-26G>A	77
2.5.2.1	Transfección en cultivos celulares	77
2.5.2.2	Extracción de ARN	78
2.5.2.3	RT-PCR	78
2.5.2.4	Purificación y secuenciación	78
2.5.3	Obtención de variantes adaptadas de U1snRNA	78
2.5.4	Ensayo terapéutico en modelo in vitro de la mutación c.445+1G>A	79
3	RESULTADOS	80
3.1	Diagnóstico molecular de la fibrosis quística	80
3.1.1	Análisis del gen CFTR en pacientes del grupo A	80

3.1.2	Análisis de mutaciones frecuentes en pacientes del grupo B	83
3.1.3	Predicción del efecto de mutaciones mediante análisis informático	83
3.1.3.1	Investigación de la variante H1085L	84
3.1.3.2	Investigación de la variante G27R	85
3.1.3.3	Investigación de la variante W277R	86
3.1.4	Actualización de la frecuencia de mutaciones en los pacientes diagnosticados con fibrosis quística en CEMECO desde 1996 hasta la fecha	87
3.2	Diagnóstico de la enfermedad de Sandhoff	90
3.2.1	Investigación a nivel bioquímico	90
3.2.1.1	Determinación de la actividad Hexosaminidasa en pacientes con sospecha de enfermedad de Sandhoff	90
3.2.2	Determinación de la actividad Hexosaminidasa en familiares de pacientes con enfermedad de Sandhoff	92
3.2.3	Investigación a nivel molecular	92
3.2.3.1	Estudio de la mutación más frecuente c.445+1G>A en pacientes con enfermedad de Sandhoff y familiares	92
3.2.4	Análisis de las 6 mutaciones identificadas previamente en pacientes argentinos	94
3.2.5	Secuenciación del gen HEXB en pacientes con genotipo incompleto o desconocido	94
3.2.6	Actualización de la frecuencia de mutaciones en los pacientes diagnosticados con enfermedad de Sandhoff en CEMECO	97
3.2.7	Resumen de pacientes diagnosticados con enfermedad de Sandhoff	97
3.3	Investigación de mutaciones causantes de enfermedad de Sandhoff en la población de Traslasierra de Córdoba	99
3.3.1	Mutaciones detectadas en la muestra poblacional	99

3.3.2	Comparación entre valores enzimáticos y moleculares de la muestra poblacional	100
3.4	Ensayos <i>in vitro</i> en modelos de mutaciones intrónicas en el gen <i>HEXB</i>	101
3.4.1	Obtención de minigenes portadores de las mutaciones c.445+1G>A y c.1509-26G>A	101
3.4.2	Análisis funcional <i>in vitro</i> de las mutaciones intrónicas c.445+1G>A y c.1509-26G>A	102
3.4.3	Obtención de variantes adaptadas de U1snRNA	104
3.4.4	Ensayo terapéutico en modelo <i>in vitro</i> de la mutación c.445+1G>A	105
4	DISCUSIÓN	107
4.1	Diagnóstico molecular de la fibrosis quística	107
4.1.1	Variantes ya descritas identificadas en el gen CFTR	107
4.1.2	Variante nueva c.3254A>T (H1085L)	109
4.1.3	Análisis computacional predictivo para variantes de efecto desconocido	110
4.1.4	Relación genotipo-fenotipo en los pacientes estudiados	112
4.1.5	Prevalencia de las mutaciones identificadas en el gen CFTR	113
4.2	Diagnóstico bioquímico y molecular de la enfermedad de Sandhoff	115
4.2.1	Determinación enzimática de las Hexosaminidasas	115
4.2.2	Mutaciones ya descritas identificadas en el gen HEXB	116
4.2.3	Variante nueva c.1209dupT (p.Val404Cysfs*7)	117
4.2.4	Prevalencia de las mutaciones identificadas en el gen HEXB	118
4.2.5	Diagnóstico de los pacientes con enfermedad de Sandhoff variante infantil	119
4.2.6	Diagnóstico de la variante juvenil de enfermedad de Sandhoff	119
4.2.7	Detección de portadores	120
4.3	Investigación de mutaciones causantes de enfermedad de Sandhoff en la población de Traslasierra de Córdoba	122

4.3.1	Análisis de las mutaciones detectadas en la muestra poblacional	122
4.3.2	Comparación entre resultados enzimáticos y moleculares	122
4.4	Ensayos <i>in vitro</i> en modelos de mutaciones intrónicas en el gen <i>HEXB</i>	124
4.4.1	Minigenes modelos de las mutaciones c.445+1G>A y c.1509-26G>A	124
4.4.2	Ensayo terapéutico en modelo <i>in vitro</i> de la mutación c.445+1G>A	125
5	CONCLUSIONES	128
6	BIBLIOGRAFIA	129
7	ANEXO – Publicación en Archivos Argentina de Pediatría 2017	150

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Manifestaciones clínicas en la fibrosis quística agrupadas según edad	27
Tabla 2. Mutaciones causantes de fibrosis quística más frecuentes a nivel mundial	30
Tabla 3. Mutaciones causantes de fibrosis quística identificadas en pacientes diagnosticados en CEMECO desde 1996 hasta el año 2012	35
Tabla 4. Patrón referencial autóctono para la actividad de la Hexosaminidasa	48
Tabla 5. Mutaciones identificadas en los pacientes argentinos investigados	50
Tabla 6. Características clínicas principales de los pacientes con fibrosis quística	58
Tabla 7. Mutaciones previamente identificadas en pacientes con fibrosis quística	59
Tabla 8. Secuencia de los cebadores utilizados en la amplificación del gen <i>CFTR</i>	61
Tabla 9. Resumen pacientes con sospecha clínica de gangliosidosis GM2	66
Tabla 10. Valores de referencia para la actividad Hexosaminidasa	69
Tabla 11. Cebadores utilizados para análisis de la mutación c.445+1G>A	70
Tabla 12. Secuencia de los cebadores utilizados en la amplificación del gen <i>HEXB</i>	71
Tabla 13. Proveniencia de los individuos que participaron del estudio poblacional	72
Tabla 14. Cebadores para el análisis de la mutación c.782_785delCTTT (p.Ser261Cysfs*13)	73
Tabla 15. Cebadores utilizados para obtener los minigenes EX2 y EX13	75
Tabla 16. Cebadores utilizados para secuenciación del vector pSPL3	76
Tabla 17. Cebadores utilizados para mutagénesis dirigida en minigenes	77
Tabla 18. Cebadores utilizados para mutagénesis dirigida en vector pG3U1	79

Tabla 19. Mutaciones identificadas en pacientes del grupo A	81
Tabla 20. Características de las mutaciones detectadas en pacientes grupo A	82
Tabla 21. Mutaciones identificadas en pacientes del grupo B	83
Tabla 22. Mutaciones causantes de fibrosis quística detectadas en pacientes diagnosticados en CEMECO desde 1996 hasta la fecha	88
Tabla 23. Actividad Hexosaminidasa en pacientes con sospecha clínica de GM2	91
Tabla 24. Actividad Hexosaminidasa en familiares de pacientes con enfermedad de Sandhoff	92
Tabla 25. Genotipo para la mutación c.445+1G>A en pacientes con enfermedad de Sandhoff y familiares	93
Tabla 26. Frecuencia de mutaciones causantes de enfermedad de Sandhoff a nivel local	97
Tabla 27. Características principales de los pacientes diagnosticados con enfermedad de Sandhoff	98
Tabla 28. Mutaciones detectadas en la muestra poblacional	99

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de la proteína CFTR	25
Figura 2. El rol de CFTR en las glándulas sudoríparas	26
Figura 3. El rol de CFTR en las vías respiratorias	27
Figura 4. Clasificación de las mutaciones causantes de fibrosis quística desde un punto de vista funcional	32
Figura 5. Espectro fenotípico según actividad CFTR	32
Figura 6. Estructura de la molécula de gangliósido GM2	39
Figura 7. Catabolismo del gangliósido GM2	39
Figura 8. Rol del Activador GM2	41
Figura 9. El sistema de las Hexosaminidasa y sus enfermedades asociadas	41
Figura 10. Signos principales en la enfermedad de Sandhoff infantil	43
Figura 11. Mapa de la zona de riesgo	45
Figura 12. Valores enzimáticos obtenidos del muestreo poblacional 2007	49
Figura 13. Representación esquemática del funcionamiento de un minigen	54
Figura 14. Ilustración de la ribonucleoproteína U1	55
Figura 15. Algoritmo de trabajo para el diagnóstico molecular en pacientes con fibrosis quística	60
Figura 16. Algoritmo de trabajo para el diagnóstico de pacientes con enfermedad de Sandhoff	68
Figura 17. Protocolo general para obtención de minigenes.	74
Figura 18. Mutación c.3254A>T (H1085L)	81
Figura 19. Predicción SIFT para la variante c.3254A>T (H1085L)	84
Figura 20. Predicción POLYPHEN para la variante c.3254A>T (H1085L)	84
Figura 21. Predicción HSF para la variante c.3254A>T (H1085L)	84
Figura 22. Predicción SIFT para la variante c.79A>G (G27R)	85
Figura 23. Predicción POLYPHEN para la variante c.79A>G (G27R)	85
Figura 24. Análisis HSF para la variante c.79A>G (G27R)	86
Figura 25. Predicción SIFT para la variante c.829T>A (W277R)	86
Figura 26. Predicción POLYPHEN para la variante c.829T>A (W277R)	86
Figura 27. Predicción HSF para la variante c.829T>A (W277R)	87

Figura 28. Mutaciones c.796T>G (p.Tyr266Asp) y c.1615C>T (p.Arg539Cys)	95
Figura 29. Mutación c.1209dupT (p.Val404Cysfs*7)	96
Figura 30. Efectos en la proteína de la mutación c.1209dupT (p.Val404Cysfs*7)	96
Figura 31. Actividad enzimática y portadores de c.445+1G>A en la muestra poblacional	100
Figura 32. Representación esquemática de los minigenes EX2 y EX13	102
Figura 33. Análisis funcional en el minigen EX2	103
Figura 34. Análisis funcional en el minigen EX13	104
Figura 35. Variantes de U1snRNA para la mutación c.445+1G>A	105
Figura 36. Perfil transcripcional del minigen EX2-MUT co-transfectado con variantes U1snRNA	106
Figura 37. Control de transfección de las variantes U1snRNA	106



## RESUMEN

Durante el período 1970-2017, en CEMECO se han diagnosticado 151 pacientes con fibrosis quística y 110 pacientes con enfermedad de Sandhoff, convirtiéndose éstas en las enfermedades metabólicas con mayor registro local de pacientes.

**Objetivo general 1.** Contribuir a la caracterización molecular de los genes *CFTR* y *HEXB* e integrarlo al estudio multidisciplinar de las enfermedades fibrosis quística y de Sandhoff, desde una perspectiva que abarque desde el genoma al fenoma.

FIBROSIS QUÍSTICA (FQ). Enfermedad genética, autosómica recesiva, caracterizada por la disfunción de las glándulas de secreción exócrina, a partir de mutaciones en el gen *CFTR*. El funcionamiento defectuoso de la proteína CFTR altera el transporte de cloro y sodio en las células secretoras epiteliales, lo que provoca complejas manifestaciones clínicas en varios órganos, siendo la afectación pulmonar responsable del 85% de la mortalidad. En nuestro país se estima que presenta una incidencia de 1 por cada 7213 recién nacidos.

**Objetivo específico para FQ.** Investigar a nivel molecular pacientes confirmados bioquímicamente con FQ o con características clínicas compatibles a alteraciones en el gen *CFTR*, incluyendo el análisis de todos los exones y regiones flanqueantes del gen *CFTR*.

**Resultados.** Se identificó el genotipo completo en 14 de los 17 pacientes estudiados y se detectaron 14 mutaciones diferentes del gen *CFTR*. La mutación c.3254A>T, p.His1085Leu, resultó nueva a nivel mundial.

ENFERMEDAD DE SANDHOFF (ES). Patología de almacenamiento lisosomal, de herencia autosómica recesiva, neurodegenerativa y letal en su variante infantil, causada por mutaciones en el gen *HEXB*. En esta enfermedad existe un defecto en la subunidad  $\beta$  de una enzima lisosomal llamada Hexosaminidasa, la cual tiene como función el clivaje de una serie de sustratos fisiológicos, particularmente el Gangliósido GM2. Esta patología fue reconocida en diferentes comunidades, aunque se destaca la casuística de la población de Traslasierra de Córdoba, Argentina, la mayor registrada a nivel mundial, con una incidencia de enfermos de 1 por cada 763 recién nacidos.

**Objetivo específico para ES.** Investigar pacientes con sospecha de enfermedad de Sandhoff, tanto a nivel bioquímico como molecular, incluyendo, en los casos confirmados, el estudio de sus familias.

**Resultados.** En total, se caracterizaron 8 pacientes. Siete de ellos presentaron la variante infantil de la enfermedad, 1 resultó con la variante juvenil, siendo este el primer caso registrado en Argentina. A nivel molecular, se detectaron 5 variantes diferentes en el gen *HEXB*, 4 previamente caracterizadas y 1 variante nueva a nivel mundial, c.1209dupT (p.Val404Cysfs\*7). Además se propuso realizar una investigación a nivel poblacional en la zona de riesgo, con el fin de estudiar la frecuencia de mutaciones previamente detectadas en nuestros pacientes. Entre los 200 individuos sanos investigados, se identificaron 9 portadores de la mutación c.445+1G>A, confirmándose ésta, como la variante causante de ES más frecuente en Argentina.

**Objetivo general 2.** Aportar un mayor entendimiento de los mecanismos moleculares implicados en los ensayos *in vitro* con ribonucleoproteínas modificadas y en la terapia antisentido, valorando su uso como forma de terapia posible para pacientes con enfermedad de Sandhoff.

**Resultados.** Se obtuvieron 2 minigenes para dos variantes intrónicas frecuentes en el gen *HEXB*, c.445+1G>A y c.1509-26G>A. Estos modelos se utilizaron posteriormente para ensayos funcionales y se demostró que los minigenes son representativos del efecto de las mutaciones a nivel *in-vivo*, resultando en modelos útiles para el estudio de la enfermedad. Por otra parte, el minigen con la mutación c.445+1G>A se utilizó para evaluar el uso de variantes adaptadas de U1ARN<sub>pn</sub> como estrategia terapéutica y se concluyó que el tratamiento con U1snARN adaptadas no tiene un efecto corrector en el proceso de corte y empalme alterado por la mutación c.445+1G>A.

**Conclusiones.** Los resultados obtenidos en esta Tesis permitieron una mayor caracterización genético-molecular de pacientes con fibrosis quística y enfermedad de Sandhoff. Se identificaron nuevas variantes alélicas tanto en el gen *CFTR* como *HEXB*, que posibilita un mejor asesoramiento genético al paciente y sus familias. Además se logró dar los primeros pasos en la generación de modelos *in vitro* que permitan, a futuro, la evaluación de diferentes enfoques terapéuticos para el tratamiento de estas patologías.

## ABSTRACT

During the period from 1970 to 2017, 151 patients were diagnosed with cystic fibrosis and 110 patients with Sandhoff disease in CEMECO, making these diseases the two most diagnosed according to the local registry of patients.

**Objective 1.** To contribute to the molecular characterization of *CFTR* and *HEXB* genes and to integrate this knowledge into the multidisciplinary study of cystic fibrosis and Sandhoff disease, including a perspective from the genome to phenome level.

**CYSTIC FIBROSIS (CF).** Genetic disease of autosomal recessive inheritance characterized by the dysfunction of the exocrine glands. It is caused by mutations in the *CFTR* gene. The defective functioning of the CFTR protein alters the transport of chloride and sodium in epithelial secretory cells, which causes complex clinical manifestations in several organs, with pulmonary disease accounting for 85% of mortality. In Argentina, it is estimated that the incidence of cystic fibrosis is 1 in every 7213 newborns.

**Specific objective for CF.** To study patients diagnosed with CF or suspected *CFTR* gene related diseases, using molecular techniques that allow for the analysis of all of the exons and flanking regions of the *CFTR* gene.

**Results.** Identification of the complete genotype was achieved in 14 out of 17 of the patients studied and 14 different variants of the *CFTR* gene were detected. The mutation c.3254A>T, p.His1085Leu, had not yet been reported in other studies.

**SANDHOFF DISEASE (SD).** Neurodegenerative disorder characterized by an accumulation of GM2 gangliosides in neurons. It is caused by mutations in the *HEXB* gene affecting the  $\beta$  subunit of hexosaminidases. This pathology has been identified in different communities, although the casuistry of the population of Traslasierra de Córdoba, Argentina, stands out as the largest in the world. In this community, the incidence of this disease is 1 in every 763 newborns.

**Specific objective for SD.** To study patients with suspected Sandhoff disease, both at a biochemical and molecular level, including, in confirmed cases, the study of their families.

**Results.** In total, 8 patients with Sandhoff disease were characterized clinically, biochemically and molecularly. Seven of them presented the infantile form of the disease while 1 was diagnosed with the juvenile variant, with this being the first case reported in Argentina. At the molecular level, 5 different variants were detected in the *HEXB* gene, 9 previously characterized and 1 new variant worldwide, c.1209dupT, p.Val404Cysfs\*7. In addition, a population-based study was conducted in the risk area in order to investigate the frequency of previously detected mutations in Argentinean patients. Among the 200 healthy individuals investigated, 9 carriers of the c.445+1G>A mutation were identified, confirming this as the most frequent cause of Sandhoff disease in Argentina.

**Objective 2.** To add a better understanding of the molecular mechanisms involved in the *in vitro* essays using adapted ribonucleoproteins and antisense therapy, valuing their use as a possible therapy for Sandhoff disease.

**Results.** Two minigenes were obtained for two frequent intron variants in the *HEXB* gene, c.445+1G>A and c.1509-26G>A. These models were later used for functional tests and it was demonstrated that the minigenes are representative of the effect of mutations at the *in vivo* level, making these models useful for the study of the disease. On the other hand, the minigene with the c.445+1G>A mutation was used to evaluate the use of adapted variants of U1ARN<sub>pn</sub> as a therapeutic strategy and it was concluded that the treatment with adapted U1snRNA does not have a corrective effect on the splicing process altered by the c.445+1G>A mutation.

**Conclusions.** In summary, the results obtained from this study allowed for the molecular characterization of patients with cystic fibrosis and Sandhoff disease. This contributed to the identification of new allelic variants in both the *CFTR* and *HEXB* genes, facilitating genetic counseling for the patient and their families. The generation of effective *in vitro* models was also achieved, which, in the future, may allow for the evaluation of different therapeutic approaches for the treatment of these pathologies.

## ABREVIATURAS

AAV: Virus Adenoasociados (*Adeno-Associated Virus*)

ABC: Proteínas Transportadoras Dependientes de Adenosín Trifosfato (*ATP Binding Cassette transporters*)

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

ADNc: Ácido Desoxirribonucleico copia

AMPc: Adenosín Monofosfato Cíclico

Amp<sup>R</sup>: Gen de Resistencia a la ampicilina

ARN: Ácido Ribonucleico

ARNm: Ácido Ribonucleico Mensajero

ATP: Adenosín Tri Fosfato

CBAVD: Agenesia Bilateral Congénita de Conductos Deferentes (*Congenital Bilateral Absence of the Vas Deferens*)

CFTR: Proteína Reguladora de la Conductancia Transmembrana de la Fibrosis Quística (*Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*)

CFTR-RD: Enfermedades Relacionadas al gen *CFTR* (*CFTR related diseases*)

CIEIS: Comité Interinstitucional de Ética de la Investigación de la Salud

DGGE: Electroforesis en Gel de Gradiente Desnaturalizante

dNTP: DeoxiribonucleotidoTrifosfato

EDTA: Ácido Etilendiaminotetraacético

ENaC: Canal de Sodio Sensible al Amiloride

ES: Enfermedad de Sandhoff

ESE: Estimuladores exónicos del proceso de corte y empalme (*Exonic Splicing Enhancers*)

ESS: Silenciadores exónicos del proceso de corte y empalme (*Exonic Splicing Silencers*)

FDA: Administración de Medicamentos y Alimentos (*Food and Drug Administration*)

FQ: Fibrosis Quística

Gal: D-galactosa

GalNAc: N-acetil-D-galactosamina

Glc: D-glucosa

Hex: Hexosaminidasa

HUGO: Organización del Genoma Humano (*Human Genome Organisation*)

IPTG: Isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido

Kb: Kilobase

LB: Agar-medio Luria Broth

LSD: Enfermedad de almacenamiento lisosomal (*Lysosomal Storage Disease*)

MCBs: Cuerpos Membranosos de la Región Perinuclear (*Membranous Cytoplasmic Bodies*)

MEM: Medio Esencial Mínimo

MPS: Mucopolisacaridosis

NBD: Dominio de Unión a Nucleótido (*Nucleotide Binding Domain*)

NeuAc: Ácido Siálico

OMIM: Herencia Mendeliana en el Hombre (*Online Mendelian Inheritance in Man*)

ORF: Marco abierto de lectura (*Open Reading Frame*)

PALs: Patologías de Almacenamiento Lisosomal

PAS: Ácido Peryódico de Schiff

PBS: Tampón Fosfato Salino

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

pH: Potencial de Hidrógeno

PKA: Proteína quinasa A (*Protein Kinase A*)

PTC: Codón de Terminación Prematura

PWM: Matrices de Peso Posicionales (*Position Weight Matrix*)

REPIS: Registro Provincial de Investigación en Salud

RMN: Resonancia Magnética Nuclear

RT-PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcriptasa Inversa

snARN: ARN pequeño nuclear (*Small Nuclear ARN*)

SNP: Polimorfismo de Nucleótido Simple

SSCA: Análisis Conformacional de Simple Hebra

TIR: Tripsina inmunoreactiva

TM: Dominio Transmembrana

TRE: Terapia de Reemplazo Enzimático

UTR: Regiones No Traducidas

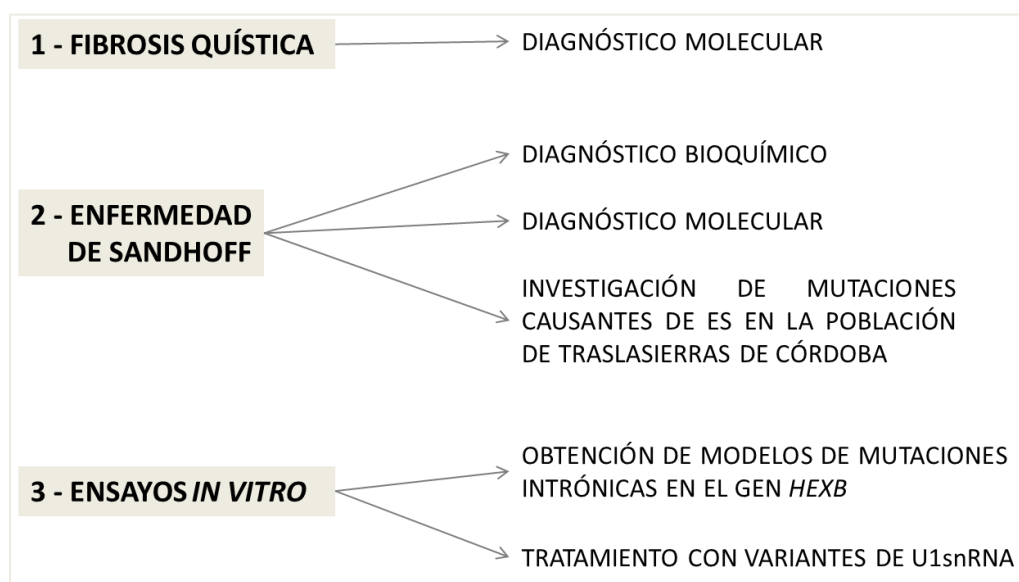
WT: Variante tipo salvaje (*Wild Type*)

## PRÓLOGO

Durante el período 1970-2012, en el Centro de Estudio de las Metabolopatías Congénitas (CEMECO), Cátedra de Clínica Pediátrica, Facultad de Ciencias Médicas, UNC, Hospital de Niños de Córdoba, se diagnosticaron 148 pacientes con fibrosis quística (FQ) y 102 con enfermedad de Sandhoff (ES), convirtiéndose en las enfermedades metabólicas hereditarias con mayor registro local de pacientes.

En el año 2012 se inició este trabajo de Tesis, con el propósito de continuar investigando la estructura molecular subyacente en ambas patologías, y también, se propuso realizar estudios a nivel *in vitro* con el fin último de evaluar estrategias terapéuticas. Se desprende la importancia de los objetivos planteados, considerando el significativo registro local de pacientes, la relevancia que tiene el diagnóstico molecular y la necesidad imperiosa de hallar un tratamiento para estas enfermedades genéticas.

Para facilitar la lectura de esta Tesis se presenta a continuación un esquema que resume las distintas partes de este trabajo:





# 1 INTRODUCCIÓN

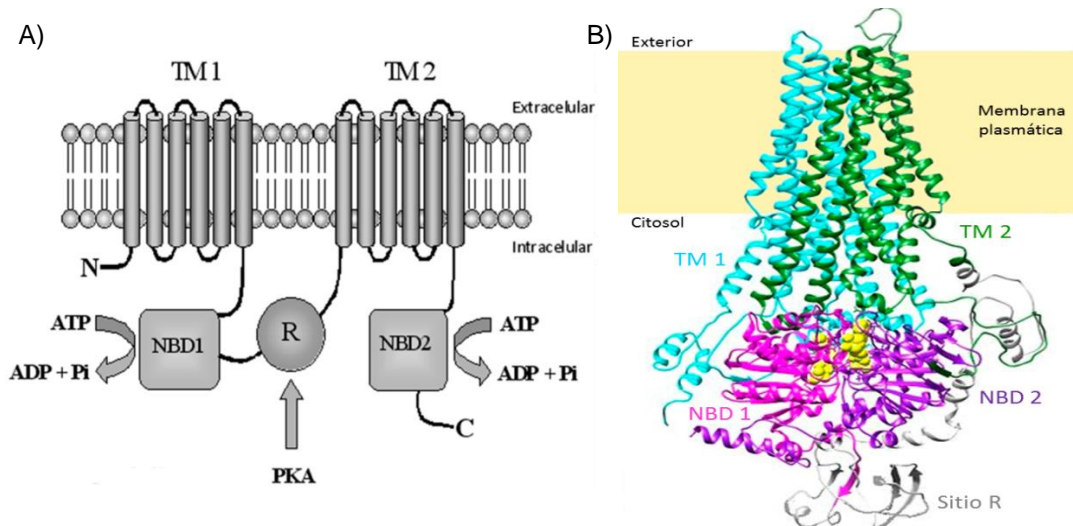
## 1.1 FIBROSIS QUÍSTICA

La fibrosis quística (FQ, MIM 219700) es la enfermedad hereditaria autosómica recesiva más frecuente en la población mundial. Es una patología crónica y multisistémica que afecta principalmente al sistema respiratorio, aparato digestivo, glándulas sudoríparas y órganos reproductores. La FQ es causada por mutaciones en el gen *CFTR*, que codifica para la proteína homónima CFTR. Las siglas CFTR refieren al nombre, en inglés, *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*, que, en español, significa proteína reguladora de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística (Welsh et al., 2001; Tizziano y Gartner, 2004; Castaños et al., 2014).

### 1.1.1 Proteína CFTR

La proteína CFTR es un transportador que se encuentra en la membrana apical de las células epiteliales de las glándulas exocrinas. Su secuencia peptídica está formada por 1480 aminoácidos y tiene un peso molecular de 180 KDa. En condiciones normales, se encuentra glicosilada en la cara extracelular de la región transmembrana (Sheppard y Welsh, 1999; Palma et al., 2014).

CFTR es miembro de la superfamilia de proteínas transportadoras dependientes de adenosín trifosfato (ATP), denominadas ABC (por sus siglas en inglés, *ATP Binding Cassette transporters*), existentes tanto en organismos procariontas como eucariotas (Wilkens, 2015; Meng et al., 2017a). Su estructura principal consiste en 5 dominios: Dos transmembrana (TM), dos de unión a nucleótido (NBD) y un sitio regulador R (Fig. 1). Las regiones TM consisten en seis vueltas de estructura alfa hélice, cada una unida a un NBD citoplasmático que posee un sitio de unión al ATP. La región R es una característica diferencial de la proteína CFTR respecto a la típica estructura de los transportadores tipo ABC. El sitio regulador puede ser activado por la proteína quinasa dependiente de adenosín monofosfato cíclico (AMPc), del inglés, *protein kinase A* (PKA), o inactivado por otras fosfatasa (Palma et al., 2014; Bose et al., 2015).

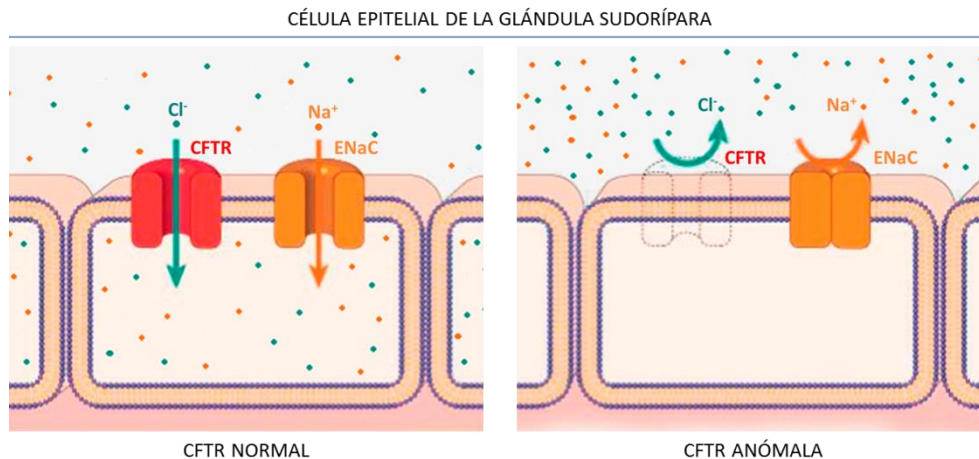


**Figura 1. Estructura de la proteína CFTR.** **A)** Ilustración adaptada de Palma et al., 2014. Se destacan los 5 dominios de la proteína: TM1, TM2, NBD1, NBD2 y sitio R. **B)** Representación tridimensional en cinta adaptada de Bose et al., 2015. TM1 (turquesa), TM2 (verde), NBD1 (rosa), NBD2 (violeta) y Sitio R (gris). Al centro de la estructura en color amarillo se distinguen dos moléculas de ATP.

Mientras que la gran mayoría de los transportadores ABC funcionan mediante cambios conformacionales de las regiones transmembrana, CFTR actúa como un canal de cloro cuya apertura o cierre es regulado, tanto por la hidrólisis de ATP, como por la acción de AMPc (Palma et al., 2014; Wilkens, 2015; Meng et al., 2017a). La función principal de la proteína CFTR es el intercambio de iones cloruro entre el interior y exterior celular, jugando un papel clave en la homeostasis del agua y el equilibrio iónico. También se sabe que puede transportar bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) y que tiene un rol regulador sobre otros canales iónicos, particularmente en el canal de sodio sensible al amiloride (ENaC), que controla el paso del  $\text{Na}^+$  desde el exterior al interior celular (Palma et al., 2014; Meng et al., 2017a).

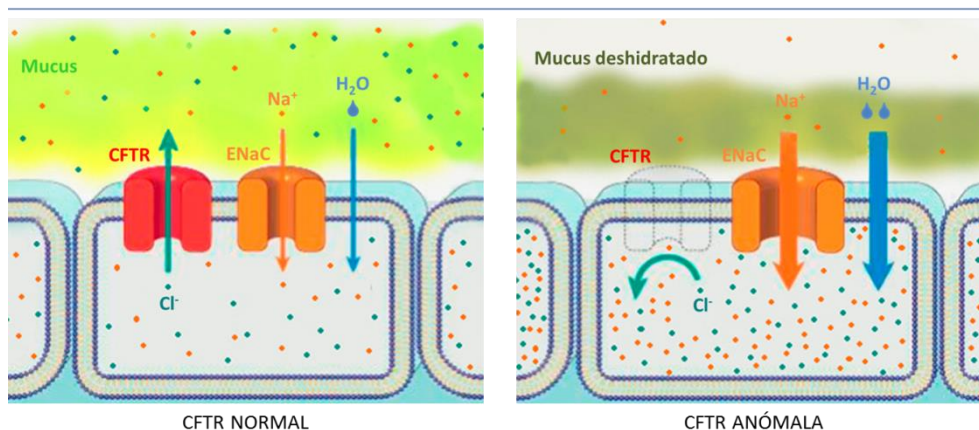
Cuando la proteína CFTR es defectuosa o tiene su función limitada, se desencadenan una serie de eventos a nivel celular que causan la FQ (Castaños et al., 2014). En las células epiteliales de las glándulas sudoríparas, CFTR tiene como función la reabsorción del  $\text{Cl}^-$  extracelular. Cuando CFTR es deficiente, el  $\text{Cl}^-$  permanece en el exterior celular generando un exceso de carga negativa que afecta al balance iónico. El transportador ENaC, que en condiciones normales transporta  $\text{Na}^+$  hacia el interior celular, detiene su función de manera que los iones  $\text{Na}^+$  compensen la carga eléctrica del medio

extracelular (Fig. 2) (Palma et al., 2014; Anirban, 2015). Como consecuencia de estos eventos, las secreciones de las glándulas sudoríparas en la FQ tienen una alta concentración de sales, generando el típico “sudor salado”, una de las características distintivas en esta enfermedad (Welsh et al., 2001; Castaños et al., 2014).



**Figura 2. El rol de CFTR en las glándulas sudoríparas.** En condiciones normales, la proteína CFTR transporta Cl<sup>-</sup> hacia el interior celular. Cuando CFTR es deficiente el Cl<sup>-</sup> se acumula en el exterior celular provocando un desequilibrio eléctrico. Como consecuencia, el transportador ENaC detiene el ingreso a la célula de cationes Na<sup>+</sup> que también se acumulan en el medio extracelular. Los puntos verdes y naranjas corresponden a iones Cl<sup>-</sup> y Na<sup>+</sup>, respectivamente (Adaptado de Anirban, 2015).

En las células epiteliales que revisten el sistema respiratorio, la función de CFTR es la de expulsar el Cl<sup>-</sup> desde el interior celular hacia el medio exterior. En la FQ la proteína es deficiente, por tanto el Cl<sup>-</sup> queda retenido en el interior celular, generando un mayor ingreso de cationes Na<sup>+</sup> por parte del transportador ENaC. Al mismo tiempo, ingresa por osmosis un mayor volumen de agua debido a la gran concentración de electrolitos en el interior celular. Como resultado, el medio extracelular presenta un gran desbalance iónico y el mucus que recubre la superficie de los epitelios respiratorios se deshidrata (Fig. 3) (Palma et al., 2014; Anirban, 2015). En la FQ, las secreciones viscosas resultan pegajosas y no permiten el barrido o *clearence* de las vías respiratorias. A largo plazo, esto permite que microorganismos oportunistas colonicen las superficies, causando de forma cíclica la tríada obstrucción-inflamación-infección de los conductos respiratorios (Welsh et al., 2001; Castaños et al., 2014).



**Figura 3. El rol de CFTR en las vías respiratorias.** La proteína CFTR en funcionamiento expulsa iones  $\text{Cl}^-$  al medio exterior, ayudando a que exista un equilibrio iónico y que el medio externo presente un mucus hidratado. Cuando la proteína CFTR es anómala, los iones  $\text{Cl}^-$  y  $\text{Na}^+$  se acumulan en el citosol, provocando el ingreso de agua en exceso. Esto genera la deshidratación del medio extracelular y la formación de secreciones mucosas densas. Los puntos verdes y naranjas corresponden a iones  $\text{Cl}^-$  y  $\text{Na}^+$ , respectivamente (Adaptado de Anirban, 2015).

### 1.1.2 Manifestaciones clínicas en la fibrosis quística

La FQ es una enfermedad multisistémica que presenta un gran espectro fenotípico (Welsh et al., 2001). Diferentes características clínicas pueden identificarse según la edad del paciente (Tabla 1, adaptada de Castaños et al., 2014).

**Tabla 1. Manifestaciones clínicas en la fibrosis quística agrupadas según edad.**

RECIÉN NACIDO	MENORES DE 2 AÑOS	NIÑOS	ADOLESCENTES Y ADULTOS
<ul style="list-style-type: none"> <li>-Íleo meconial</li> <li>-Ictericia prolongada</li> <li>-Tos y taquipnea persistente</li> <li>-Pobre ganancia de peso</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Fallo crecimiento</li> <li>-Esteatorrea</li> <li>-Infección respiratoria frecuente</li> <li>-Bronquiolitis</li> <li>-Atelectasia persistente</li> <li>-Edema</li> <li>-Hipoproteinemia</li> <li>-Prolapso rectal</li> <li>-Síndrome depleción salina</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Malabsorción</li> <li>-Fallo crecimiento</li> <li>-Tos crónica</li> <li>-Infección pulmonar recurrente</li> <li>-Bronquiectasias</li> <li>-Cultivo de secreción positivo para <i>Staphylococcus aureus</i> o <i>Pseudomonas aeruginosa</i></li> <li>-Pólipos nasales</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Pólipos nasales</li> <li>-Sinusitis crónica</li> <li>-Bronquitis crónica</li> <li>-Bronquiectasias</li> <li>-Hipocratismo digital</li> <li>-Azoospermia</li> <li>-Cirrosis biliar</li> <li>-Diabetes</li> <li>-Litiasis vesicular</li> </ul>

En la variante clásica, identificada en recién nacidos y niños, se encuentran afectados el aparato respiratorio, páncreas exócrino, glándulas sudoríparas exócrinas, sistema reproductor, intestino y sistema hepatobiliar (Welsh et al., 2001; Castaños et al., 2014). La producción de espesas secreciones bronquiales y la consecuente inflamación, causa enfermedad pulmonar obstructiva crónica e infecciones con variados gérmenes, en particular *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*. La insuficiencia pancreática exócrina ocurre en alrededor del 85-90% de los pacientes. La deficiencia resultante por la secreción anormal de enzimas pancreáticas provoca la mala absorción de grasas, proteínas e hidratos de carbono que se manifiesta como esteatorrea. El íleo meconial, presente en el 10-20% de los pacientes al nacimiento, es un signo de alta aproximación diagnóstica de la enfermedad. Entre un 95-98% de los varones presentan infertilidad masculina causada por ausencia u obstrucción de los vasos deferentes y muchas mujeres presentan una fertilidad disminuida, posiblemente debido a alteraciones en la viscosidad del moco cervical (Salcedo Posadas et al., 2004; Tormo Carciné et al., 2004; Wallis, 2012; Castaños et al., 2014).

Las variantes atípicas, también llamadas enfermedades relacionadas al gen *CFTR*, o en inglés, *CFTR related diseases (CFTR-RD)* se presentan con mayor frecuencia en adolescentes o adultos y el espectro fenotípico es extremadamente variable (Bombieri et al., 2011; Castaños et al., 2014). En general, pueden definirse como todas aquellas variantes asociadas a algún tipo de disfunción en *CFTR* pero que no cumplen todos los criterios clínicos y diagnósticos de la variante clásica de FQ. La mayoría de las formas atípicas no presentan múltiples síntomas, o incluso, puede tratarse de una única manifestación en un sólo órgano afectado. Los 3 principales tipos de enfermedades relacionadas al gen *CFTR* son: Agenesia bilateral congénita de conductos deferentes, en inglés *Congenital Bilateral Absence of the Vas Deferens (CBAVD)*, pancreatitis idiopática crónica y bronquiectasias difusas (Radpour et al., 2008; Bombieri et al., 2011; Bergougnoux et al., 2015b).

### 1.1.3 *Incidencia de la fibrosis quística*

La fibrosis quística es la enfermedad hereditaria con patrón autosómico recesivo más frecuente en el mundo. En la población europea, la incidencia se estima, en general, en 1 enfermo cada 2.500-5.000 nacimientos, dependiendo de la región o etnia de origen (Welsh et al., 2001; Tizziano y Gartner, 2004). Los países que presentan incidencias más altas son: Irlanda (1:1.353), Eslovaquia (1:1.800) y Rumania (1:2.056); mientras que Finlandia es el que presenta la más baja, con 1 enfermo por 25.000 nacimientos (Farrell, 2008).

En Argentina, no existen datos oficiales acerca de la incidencia de FQ en nuestro medio. La Fundación de Endocrinología Infantil de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires junto a la Fundación Bioquímica Argentina-Prodytec, estiman una incidencia de 1: 7.213 recién nacidos vivos, según un total de 1.831.999 recién nacidos pesquisados hasta diciembre de 2012. De esos datos, se infiere que la prevalencia de portadores sanos en la población argentina es de aproximadamente 1 en 40 personas (Castaños et al., 2014).

### 1.1.4 *Gen CFTR y mutaciones causantes de fibrosis quística*

El gen *CFTR* se localiza en el cromosoma 7, locus 7q31.2, organizado en 27 exones que ocupan una región de 180Kb. Se trata de un gen de expresión regulada que codifica para un ARNm de 6,5 Kb (Welsh et al., 2001; Castaños et al., 2014).

Mutaciones en el gen *CFTR* son la causa primaria de la FQ. En la actualidad, más de 2000 variaciones genéticas han sido identificadas en el gen *CFTR*, siendo en su mayoría mutaciones causantes de la patología (Welsh et al., 2001; Cystic Fibrosis Centre at the Hospital for Sick Children in Toronto, 2011; Veit et al., 2016). Los cambios de sentido o *missense* representan un 41%; las mutaciones de terminación prematura o *nonsense* un 10%; las que cambian el marco de lectura o *frameshift* un 18% y aquellas que alteran el corte y empalme de exones (en inglés, *splicing*) un 13%. Existe un 3% de rearrreglos genómicos (grandes deleciones o inserciones) y otro 1% de variaciones que afectan la zona promotora. Se han publicado alrededor de un 14% de cambios neutros que no ocasionan enfermedad (Welsh et al., 2001).

La mutación más frecuente a nivel mundial es una pérdida de 3 nucleótidos en el exón 11 que provoca la ausencia del aminoácido fenilalanina en posición 508 de la proteína CFTR (nomenclatura actual: c.1521\_1523delCTT, p.F508del; nomenclatura anterior:  $\Delta$ F508 o F508del). Esta mutación se encuentra en la mayoría de los alelos mutados en la población caucásica, variando su frecuencia según el país o región de origen. Por ejemplo, en Dinamarca corresponde al 88% de los alelos mutados, mientras que en el sur de Europa es aproximadamente un 50% (Welsh et al., 2001; Tizziano y Gartner, 2004; Cutting y Zeitlin, 2012). Estudios realizados en Latinoamérica también reconocen a F508del como la mutación más frecuente, encontrándose en promedio en un 50% de los casos. Sin embargo, estas frecuencias también varían, por ejemplo, en Costa Rica su frecuencia es de 22,92%, Cuba 34,03% mientras que en Argentina 59,15% (Pérez et al., 2007).

Según la base de datos de referencia *CFTR1*, existen otras mutaciones que presentan una frecuencia relativamente alta en la población mundial, destacándose, G542X, G551D, N1303K y W1282X, con porcentajes superiores al 1% (Tabla 2) (Cystic Fibrosis Centre at the Hospital for Sick Children in Toronto, 2011).

**Tabla 2. Mutaciones causantes de fibrosis quística más frecuentes a nivel mundial**

NOMENCLATURA NUEVA		NOMENCLATURA ORIGINAL	FRECUENCIA (%)
Nivel ADN	Nivel Proteína		
c.1521_1523delCTT	p.Phe508del	F508del o $\Delta$ F508	66
c.1624G>T	p.Gly542*	G542X	2,4
c.1652G>A	p.Gly551Asp	G551D	1,6
c.3909C>G	p.Asn1303Lys	N1303K	1,3
c.3846G>A	p.Trp1282*	W1282X	1,2
c.1657C>T	p.Arg553*	R553X	0,7
c.489+1G>T	-	621+1G>T	0,7
c.1585-1G>A	-	1717-1G>A	0,6
c.350G>A	p.Arg117His	R117H	0,3
c.2657+5G>A	-	2789+5G>A	0,3
			75

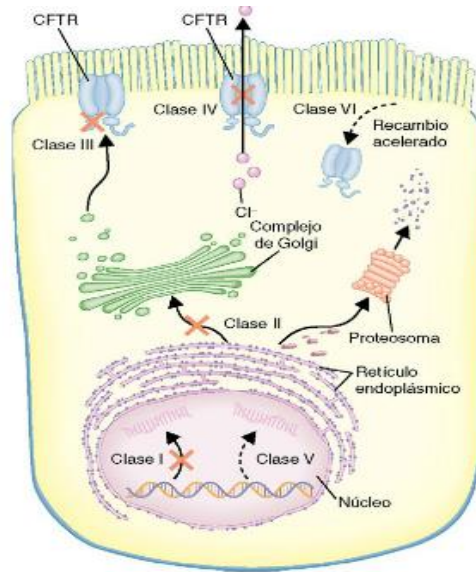
Según su efecto, las mutaciones causantes de FQ pueden clasificarse en 5 o 6 clases (Fig. 4). Clase I: Provocan la ausencia de producto proteico, en

este grupo se encuentran la mayoría de los cambios con sentido, sin sentido, los que afectan al marco de lectura y los que alteran el corte y empalme de exones en secuencias altamente conservadas, por ejemplo, las variantes G542X y 621+1G>T. Clase II: En general, son mutaciones *missense* que afectan al plegamiento y maduración de la proteína, evitando que esta alcance la membrana plasmática, como es el caso de las mutaciones F508del y N1303K. Clase III: Mutaciones que provocan cambio de sentido causan un defecto en la regulación del canal de cloro, alterando su apertura y cierre del canal de cloro. Ejemplo de esto son las variantes G551D y S549N. Clase IV: Mutaciones *missense* causan alteraciones en el canal CFTR provocando una disminución en la conductancia de los iones cloruro debido a una reducida permeabilidad y apertura del canal. Tal es el caso de las mutaciones R117H y R334W. Clase V: Provocan una disminución en la síntesis de proteína, en general se trata de variantes que afectan el sitio de corte y empalme en secuencias no conservadas, tales como las variantes 2789+5G>A, 3272-26A>G y 3849+1KbC>T (Tizziano y Gartner, 2004; Rowe et al., 2005; Cutting y Zeitlin, 2012). Otros autores mencionan un sexto tipo de mutaciones, la clase VI, que incluye variantes que disminuyen la estabilidad de la proteína. En general, se trata de mutaciones que generan cambios en el marco de lectura o codones de terminación prematura en los últimos 70-100 aminoácidos de la región C terminal. La proteína CFTR resultante alcanza su madurez pero se degrada 5-6 veces más rápido que la normal. Ejemplos de este tipo son las mutaciones 4279insA, 4326delTC y Q1412X (Kreindler, 2010; Elborn y Vallieres, 2014).

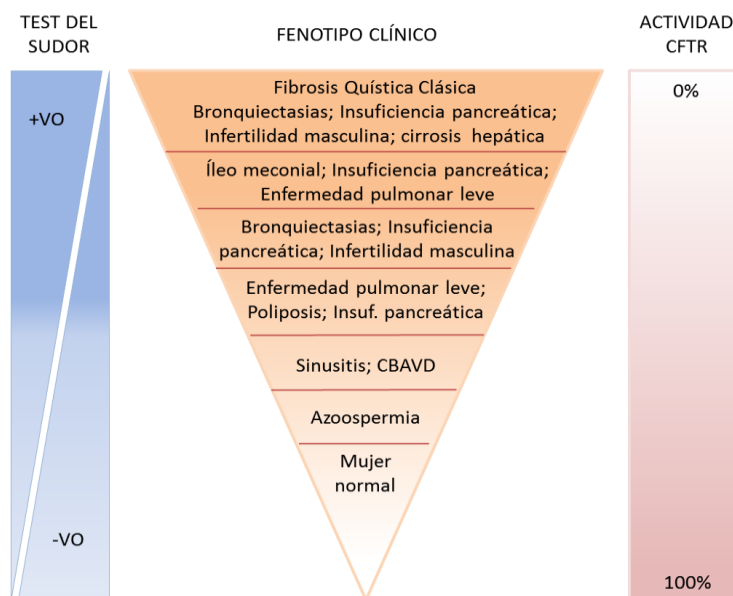
#### 1.1.5 Correlación genotipo-fenotipo

La variabilidad de fenotipos resultante en la FQ se correlaciona con la cantidad de proteína funcional disponible en el organismo, como consecuencia de las diferentes mutaciones en el ADN (Fig. 5) (Anirban, 2015).





**Figura 4. Clasificación de las mutaciones causantes de fibrosis quística desde un punto de vista funcional.** Adaptado de Rowe et al., 2005.



**Figura 5. Espectro fenotípico según actividad CFTR.** Adaptado de Anirban, 2015.  
+VO: Valores positivos. -VO: Valores negativos.

En algunos casos, es posible establecer relaciones entre el genotipo del paciente y las manifestaciones clínicas de la enfermedad. En general, se asume que las mutaciones de clase I y II, que no generan producto proteico o producen proteínas defectuosas que no alcanzan a localizarse en la membrana plasmática, causan FQ clásica, presentando insuficiencia pancreática, síntomas sinopulmonares crónicos, esterilidad en varones y altas concentraciones de electrolitos en el sudor. Ejemplos de mutaciones que en

combinación provocan fenotipo severo son: F508del, G542X, N1303K, W1282X, R553X, 621+1G>T, 1717-1G>A, entre las más frecuentes (Tizziano y Gartner, 2004; Cutting y Zeitlin, 2012; Anirban, 2015).

En el caso que el paciente presente al menos una de las mutaciones de clase III, IV y V, el fenotipo resultante puede ser extremadamente variable, desde FQ clásica hasta presentaciones con suficiencia pancreática, enfermedad pulmonar leve, o incluso, enfermedades monosintomáticas como en el caso de la agenesia bilateral congénita de conductos deferentes. Los ejemplos más conocidos de este tipo de variantes son: R117H, 3272-26G>A, IVS85T, 3849+10kbC>T (Tizziano y Gartner, 2004; Cutting y Zeitlin, 2012; Anirban, 2015).

#### 1.1.6 Diagnóstico de la fibrosis quística

La detección temprana de la FQ es fundamental para una mejor calidad de vida de los niños afectados. Su estudio está incluido en los programas de pesquisa neonatal mediante la determinación de la tripsina inmunoreactiva (TIR). Aquellos individuos con resultados positivos, deben ser analizados clínicamente y estudiados mediante test bioquímicos o moleculares. Para confirmar la patología, se requiere alguno de los siguientes resultados: I) Prueba del sudor positiva en al menos 2 ocasiones; II) Identificación de 2 mutaciones en el gen *CFTR* causantes de FQ; III) Demostración de diferencia de potencial nasal trans-epitelial anormal (Wallis, 2012; Castaños et al., 2014).

El test del sudor se considera la prueba *gold standard* para la confirmación de la FQ. Consiste en la estimulación de las glándulas sudoríparas mediante iontoforesis con pilocarpina, la recolección del sudor y la cuantificación de los electrolitos Cl<sup>-</sup> y Na<sup>+</sup> (Gibson y Cooke, 1959). Como resultado pueden obtenerse valores que se incluyen en 3 rangos: normal, menor a 39 mmol/L; intermedio, 40-59 mmol/L y patológico compatible con FQ, mayor a 60 mmol/L (Castaños et al., 2014).

Tanto para los pacientes con test del sudor positivo como en aquellos que presentan valores en rango intermedio, es muy importante la confirmación con el estudio genético, particularmente considerando las nuevas terapias

disponibles según el genotipo del paciente. Además, el estudio a nivel molecular es la única metodología que permite definir los pacientes con variantes atípicas ó desórdenes relacionados al gen *CFTR* y detectar portadores (Castellani y Cuppens, 2008; Castaños et al., 2014).

#### 1.1.7 *Resultados previos en CEMECO y en otros centros de Argentina*

El primer estudio molecular para fibrosis quística en Córdoba, Argentina, fue realizado en el 1995, en un trabajo colaborativo entre el Hospital de Niños de Córdoba y el Centro de Investigaciones en Química Biológica (CIQUIBIC-CONICET). En esta oportunidad se investigaron las dos mutaciones más frecuentes a nivel mundial, F508del y G542X, en 19 pacientes con FQ no emparentados; la frecuencia alélica reportada para F508del fue del 66%, mientras que la mutación G542X no fue detectada (Saleh et al., 1996).

A continuación, la Dra. Ana María Oller de Ramírez prosiguió con la colaboración entre el Hospital de Niños de Córdoba y el CIQUIBIC-CONICET, con el objetivo de diagnosticar la FQ a nivel molecular en nuevos pacientes que ingresaron a CEMECO. Hasta finales del año 2008, se diagnosticaron 148 enfermos de FQ, 138 de la variante clásica y 10 con las formas atípicas. El diagnóstico molecular comprendió la realización de 3 etapas consecutivas: a) Detección de las 3 mutaciones más frecuentes b) Determinación de las 29 mutaciones más frecuentes en el gen *CFTR*, c) Haplotipos por microsatélites d) Pesquisa completa del gen *CFTR* por análisis conformacional de simple hebra y electroforesis en gel de gradiente desnaturante con secuenciamiento de los patrones anormales. Los estudios fueron realizados por la Dra. Ana María Oller. Las etapas a y b) fueron llevadas a cabo en el laboratorio de Biología Molecular de CEMECO y CIQUIBIC, mientras que las etapas c) y d) fueron realizadas en colaboración con la Dra. Casals en el Bellvitge Biomedical Research Institute (IDIBELL), Barcelona, España (Oller Ramírez et al., 2006).

En el periodo comprendido entre 1996 y 2008, en pacientes diagnosticados en CEMECO, se detectaron 38 mutaciones causantes de FQ responsables del 87,6% de los alelos mutados. Del total de variantes, 10 de ellas presentaron una frecuencia mayor al 1%: F508del (54%), N1303K (4,9%), G542X (4,0%), 2 con 1,7% (R553X y 2789+5G>A) y 5 con 1,3% (R334W,

R1066C, 3272-26A>G, 1898+1G>A y D1152H) (Tabla 3). El porcentaje de alelos desconocidos fue del 12,4% que corresponde a 14 pacientes en los que no se pudo identificar o completar el genotipo. Una vez determinado el genotipo de los pacientes, se investigó el estado de portador en los familiares. De los 235 familiares estudiados se detectaron 156 portadores y 79 con genotipo normal (Oller Ramírez et al., 2006; Oller Ramírez et al., 2008 y datos aún no publicados).

**Tabla 3. Mutaciones causantes de fibrosis quística identificadas en pacientes diagnosticados en CEMECO desde 1996 hasta el año 2012**

<b>NOMENCLATURA NUEVA</b>		<b>NOMENCLATURA ORIGINAL</b>	<b>ALELOS (N°)</b>	<b>FRECUENCIA (%)</b>
<b>Nivel ADN</b>	<b>Nivel Proteína</b>			
c.1521_1523delCTT	p.Phe508del	F508del	<b>123</b>	<b>54</b>
c.3909C>G	p.Asn1303Lys	N1303K	<b>11</b>	<b>4,9</b>
c.1624G>T	p.Gly542*	G542X	<b>9</b>	<b>4,0</b>
c.2657+5G>A	-	2789+5G>A	<b>4</b>	<b>1,7</b>
c.1657C>T	p.Arg553*	R553X	<b>4</b>	<b>1,7</b>
c.1000C>T	p.Arg334Trp	R334W	<b>3</b>	<b>1,3</b>
c.3196C>T	p.Arg1066Cys	R1066C	<b>3</b>	<b>1,3</b>
c.3140-26A>G	-	3272-26A>G	<b>3</b>	<b>1,3</b>
c.1766+1G>A	-	1898+1G>A	<b>3</b>	<b>1,3</b>
c.3454G>C	p.Asp1152His	D1152H	<b>3</b>	<b>1,3</b>
c.254G>A	p.Gly85Glu	G85E	<b>2</b>	<b>0,88</b>
c.3528delC	p.Lys1177Serfs*15	3659delC	<b>2</b>	<b>0,88</b>
c.1679+1643G>T	-	1811+1.6kbA>G	<b>2</b>	<b>0,88</b>
c.1766G>T	p.Ser589Ile	S589I	<b>2</b>	<b>0,88</b>
c.1210-12T[5_9]	-	5T	<b>2</b>	<b>0,88</b>
c.3484C>T	p.Arg1162*	R1162X	<b>2</b>	<b>0,88</b>
c.3717+12191C>T	-	3849+10kbC>T	<b>1</b>	<b>0,44</b>
c.489+1G>T	-	621+1G>T	<b>1</b>	<b>0,44</b>
c.579+1G>T	-	711+1G>T	<b>1</b>	<b>0,44</b>
c.2988+1G>A	-	3120+1G>A	<b>1</b>	<b>0,44</b>
c.2738A>G	p.Tyr913Cys	Y913C	<b>1</b>	<b>0,44</b>
c.3873+1G>A	-	4005+1G>A	<b>1</b>	<b>0,44</b>
c.3266G>A	p.Trp1089*	W1089X	<b>1</b>	<b>0,44</b>
c.3848G>T	p.Arg1283Met	R1283M	<b>1</b>	<b>0,44</b>
c.3846G>A	p.Trp1282*	W1282X	<b>1</b>	<b>0,44</b>
c.3067_3072delATAGTG	p.Ile1023_Val1024del	3199del6	<b>1</b>	<b>0,44</b>
c.1364C>A	p.Ala455Glu	A455E	<b>1</b>	<b>0,44</b>
c.490-2A>G	-	622-2A>G	<b>1</b>	<b>0,44</b>
c.79G>A	p.Gly27Arg	G27R	<b>1</b>	<b>0,44</b>
c.829T>A	p.Trp277Arg	W277R	<b>1</b>	<b>0,44</b>
c.170G>A	p.Trp57*	W57X	<b>1</b>	<b>0,44</b>

c.349C>T	p.Arg117Cys	R117C	1	0,44
c.350G>A	p.Arg117His	R117H	1	0,44
c.2052delA	p.Lys684Asnfs*38	2184delA	1	0,44
[c.1399C>T; c.3766_3767insC]	[p.Leu467Phe; p.Leu1258PhefsX7]	[L467F; 3905insT]	1	0,44
c.1841A>G	p.Asp614Gly	D614G	1	0,44
c.1055G>A	p.Arg352Gln	R352Q	1	0,44
c.1209G>A	p.Glu403Glu	E403E	1	0,44
ALELOS DESCONOCIDOS			28 (14 pacientes)	12,4
TOTAL			228 (114 pacientes)	100,00

Por otra parte, en un trabajo realizado en 1997, llevado a cabo en el Hospital Garrahan y el Hospital de Niños "Sor Maria Ludovica" de La Plata, se estudiaron 119 pacientes con FQ y se investigaron las 10 mutaciones más frecuentes a nivel mundial. Las frecuencias alélicas detectadas fueron: F508del 57%, G542X 3.9%, W1282X 3.1%, N1303K 1.7%, 1717+1G>A 0.9%, R553X 0.4% y R1162X 0.4%, mientras que las mutaciones G551D, A1507 y S549N no fueron identificadas (Chertkoff et al., 1997).

Estudios más recientes en pacientes argentinos, en los que se investigaron las mutaciones más frecuentes, seguido del análisis completo de todos los exones del gen *CFTR*, reportaron una frecuencia alélica para F508del de 56,6% y 58,54% (Visich et al., 2002; Pepermans et al., 2016). Visich y col, en 2001, investigaron 220 familias no emparentadas y reportaron la identificación de 39 mutaciones diferentes entre las que se encuentran cinco cambios no identificados mundialmente, L6V, Y362X, 1353insT, 2594delGT y 2686insT (Visich et al., 2002). Pepermans y col., en 2016, identificaron en 116 pacientes un total de 34 variantes diferentes y dos cambios no reportados previamente, c.2554dupT y p.Leu49Pro (Pepermans et al., 2016).

#### 1.1.8 Opciones terapéuticas para la fibrosis quística

La mayoría de los tratamientos disponibles para los enfermos con FQ son aquellos de tipo sintomáticos que apuntan a compensar la insuficiencia pancreática o a minimizar la progresión de la enfermedad pulmonar. Ejemplos de esto son los tratamientos con enzimas pancreáticas, terapia inhalatoria,

kinesiología respiratoria diaria, uso de antiinflamatorios y antibióticos, etc (Castaños et al., 2014; Fajac y De Boeck, 2017).

Sin embargo, en los últimos años se desarrollaron terapias farmacológicas moleculares para mutaciones específicas. Desde el año 2012 se encuentra aprobada por la Administración de Medicamentos y Alimentos de Estados Unidos (*FDA*, por sus siglas en inglés) el medicamento Kalydeco™ (*VX-770*), comercializado por la compañía farmacéutica *Vertex*. Se trata de una droga llamada *ivacaftor* que actúa sobre el canal de cloro regulando su apertura. Se indica para el tratamiento de pacientes con FQ de 6 años o mayores con un peso de 25 kg o más y con una de las siguientes mutaciones de clase III en el gen *CFTR*: G551D, G1244E, G1349D, G178R, G551S, S1251N, S1255P, S549N o S549R. Recientemente, se amplió su uso en pacientes con FQ de 18 años o mayores con una mutación R117H en el gen *CFTR* (Schmidt et al., 2016; Fajac y De Boeck, 2017; Meng et al., 2017b).

Otro medicamento de la compañía *Vertex*, *ORKAMBI®*, se encuentra aprobado desde el año 2015. En este caso es una combinación de dos drogas, *ivacaftor* y *lumacaftor*, que en conjunto actúan para ayudar a la proteína defectuosa a plegarse adecuadamente, alcanzar la membrana plasmática y estimular la apertura del canal de cloro. *ORKAMBI®* se indica a pacientes homocigotas para la mutación F508del, la más frecuente a nivel mundial (Schmidt et al., 2016; Fajac y De Boeck, 2017; Meng et al., 2017b; Schneider et al., 2017).

## 1.2 ENFERMEDAD DE SANDHOFF

La enfermedad de Sandhoff (ES) o Gangliosidosis GM2 tipo II (OMIM 268800) es una enfermedad de almacenamiento lisosomal, caracterizada principalmente por el acúmulo progresivo del gangliósido GM2 a nivel neuronal. Junto con la enfermedad de Tay-Sachs (OMIM 272800) y con la Deficiencia de la proteína activadora del gangliósido GM2 (OMIM 272750) forma parte de las patologías llamadas Gangliosidosis GM2 (Mahuran, 1999; Gravel et al., 2001).

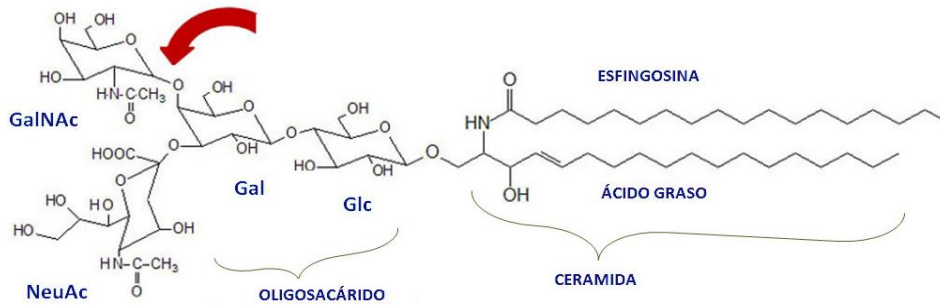
### 1.2.1 *Enfermedades lisosomales y Gangliosidosis GM2*

Se denominan enfermedades lisosomales a aquellas patologías humanas en las que resulta comprometida la estructura y función de los lisosomas. La mayor parte de ellas se caracteriza por el acúmulo lisosomal de uno o más metabolitos que en exceso resultan perjudiciales para la célula. Estas son llamadas Patologías de Almacenamiento Lisosomal (PALs) en español, o *Lysosomal Storage Disease (LSD)* en inglés (Cox y Cachón-González, 2012).

Las Gangliosidosis GM2 son un grupo de enfermedades lisosomales caracterizadas por la acumulación excesiva de diversas biomoléculas, especialmente el gangliósido GM2. En estas patologías se encuentra afectado el grupo de enzimas lisosomales llamadas Hexosaminidasas (Hex). Dado que la biosíntesis del gangliósido GM2 se produce principalmente en la materia gris cerebral, el atesoramiento se observa especialmente en las neuronas siendo las Gangliosidosis GM2 enfermedades neurodegenerativas (Gravel et al., 2001; Sandhoff y Harzer, 2013).

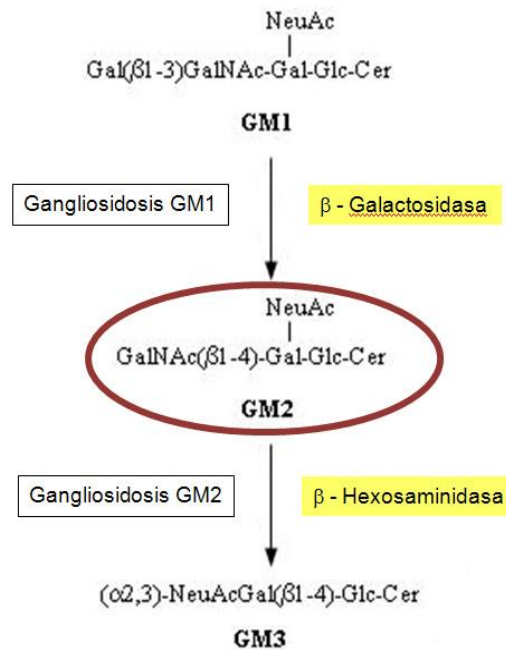
#### 1.2.1.1 *El gangliósido GM2*

El Gangliósido GM2 es un monosialogangliósido que se encuentra principalmente en las membranas plasmáticas neuronales (Fig. 6). La cadena de oligosacáridos que lo conforma se compone de una molécula de D-glucosa (Glc), una de D-galactosa (Gal), una de *N*-acetil-D-galactosamina (GalNAc) y una de ácido siálico (NeuAc) (Kolter y Sandhoff, 2006; Sandhoff y Harzer, 2013).



**Figura 6. Estructura de la molécula de gangliósido GM2.** La flecha roja indica el enlace que es cortado por la enzima Hex (Adaptado de Kolter y Sandhoff, 2006).

Una nueva molécula de gangliósido GM2 se forma a partir del gangliósido GM1 cuando la enzima  $\beta$ -galactosidasa elimina un residuo terminal de galactosa. Cuando esta enzima es deficiente se produce la enfermedad Gangliosidosis GM1. El gangliósido GM2 es hidrolizado por la  $\beta$ -hexosaminidasa que elimina el residuo terminal de *N*-acetil-D-galactosamina y lo convierte en gangliósido GM3. Cuando hay un bloqueo en el catabolismo del GM2 se producen las Gangliosidosis GM2 (Fig. 7) (Gravel et al., 2001; Dodelson de Kremer y Oller de Ramírez, 2003).



**Figura 7. Catabolismo del gangliósido GM2.** Adaptado de Dodelson de Kremer y Oller de Ramírez, 2003.



### 1.2.1.2 Complejo lisosomal de las Hexosaminidasas

En el sistema hexosaminidasa (Hex, EC: 3.2.1.52) existen 2 isoenzimas principales: Hex A, un heterodímero de subunidades  $\alpha\beta$  y Hex B, un homodímero  $\beta$ . Ambas actúan sobre una serie de sustratos fisiológicos (glicoproteínas, glicolípidos, oligosacáridos y glicosaminoglicanos o mucopolisacáridos), aunque sólo la Hex A es capaz de hidrolizar el gangliósido GM2. Además, tienen especificidad de corte en enlaces  $\beta$ -glucosídicos de residuos terminales de  $\beta$ -D-N-acetilgalactosamina y  $\beta$ -D-N-acetilglucosamina, por eso se las conoce como hexosaminidasas (Mahuran, 1999; Gravel et al., 2001; Sandhoff y Harzer, 2013).

En condiciones normales y patológicas, además de las previamente mencionadas, se conocen otras isoenzimas tales como las Hex S, I, P, C y D (Hultberg et al., 1991; Zwierz et al., 1999; Alteen et al., 2016). Entre ellas, se destaca la Hex S, compuesta por dos subunidades  $\alpha$ , responsable de la actividad Hex residual que se registra en los enfermos de Sandhoff infantil. Décadas atrás a esta isoenzima no se le atribuía importancia funcional (Srivastava et al., 1974; Beutler, 1979); sin embargo, investigaciones posteriores con Hex S recombinante determinaron que esta enzima actúa sobre un amplio rango de sustratos (glicolípidos y glicanos aniónicos y N-glicanos neutrales) y apoyan la idea que la Hex S tiene una actividad significativa *in vivo* (Mahuran, 1999; Hepbildikler et al., 2002).

Por otra parte, el activador del GM2 es una proteína lisosomal soluble que si bien no es una hidrolasa, cumple un rol fundamental asociado al sistema de las Hex. Específicamente, se encarga de unirse al gangliósido GM2 y exponerlo fuera de la membrana plasmática. De esta manera, la Hex A puede reconocer y acceder al sustrato, hidrolizarlo y convertir el gangliósido GM2 en Gangliósido GM3 (Fig. 8) (Kolter y Sandhoff, 2006).

### 1.2.1.3 Variantes enzimáticas

Hasta ahora fueron identificadas tres variantes enzimáticas no alélicas de Gangliosidosis GM2: a) Defecto o deficiencia de la subunidad  $\alpha$  de la Hex o Enfermedad de Tay-Sachs b) Defecto o deficiencia de la subunidad  $\beta$  de la Hex

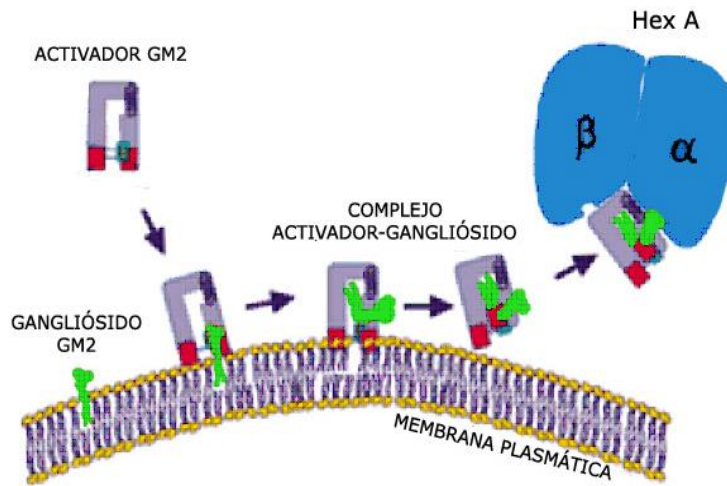


Figura 8. Rol del Activador GM2. Adaptado de Kolter y Sandhoff., 2006.

o Enfermedad de Sandhoff (ES) y c) Deficiencia de la proteína activadora del gangliósido GM2 (OMIM: 272750). Cada una de estas variantes es provocada por una mutación en un gen específico. En la Enfermedad de Tay-Sachs, el gen que codifica para la subunidad  $\alpha$  de la Hex se denomina *HEXA* y se encuentra en el par cromosómico 15 (15q23-24). En las otras dos variantes, los genes se localizan en el cromosoma 5: en la ES el gen que codifica para la subunidad  $\beta$  de la Hex se llama *HEXB* y se encuentra en el locus 5q13; en la deficiencia de la proteína activadora del gangliósido GM2 el gen que codifica para el activador del GM2 se denomina *GM2A* y se encuentra en el locus 5q32-33 (Fig. 9) (Mahuran, 1999; Gravel et al., 2001).

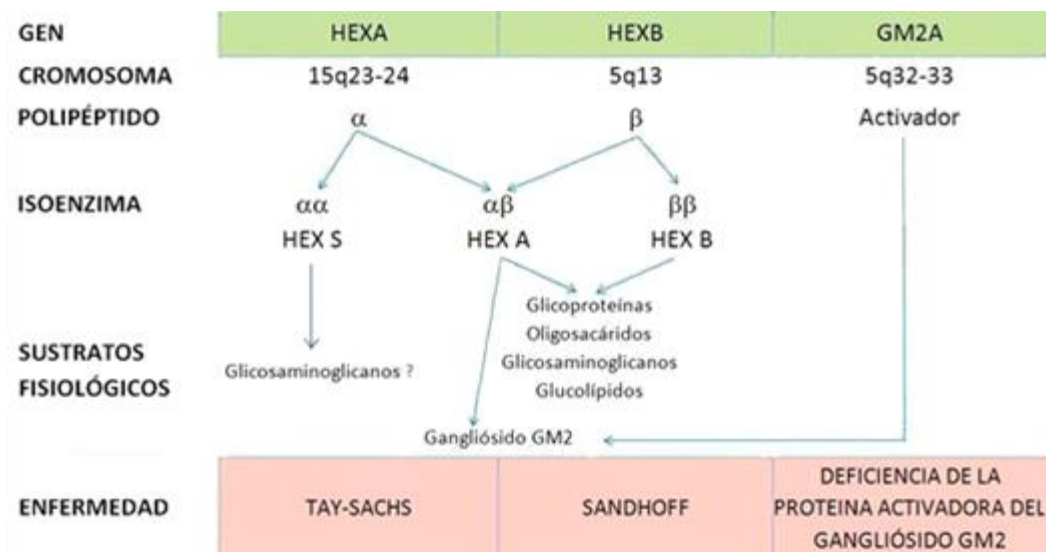


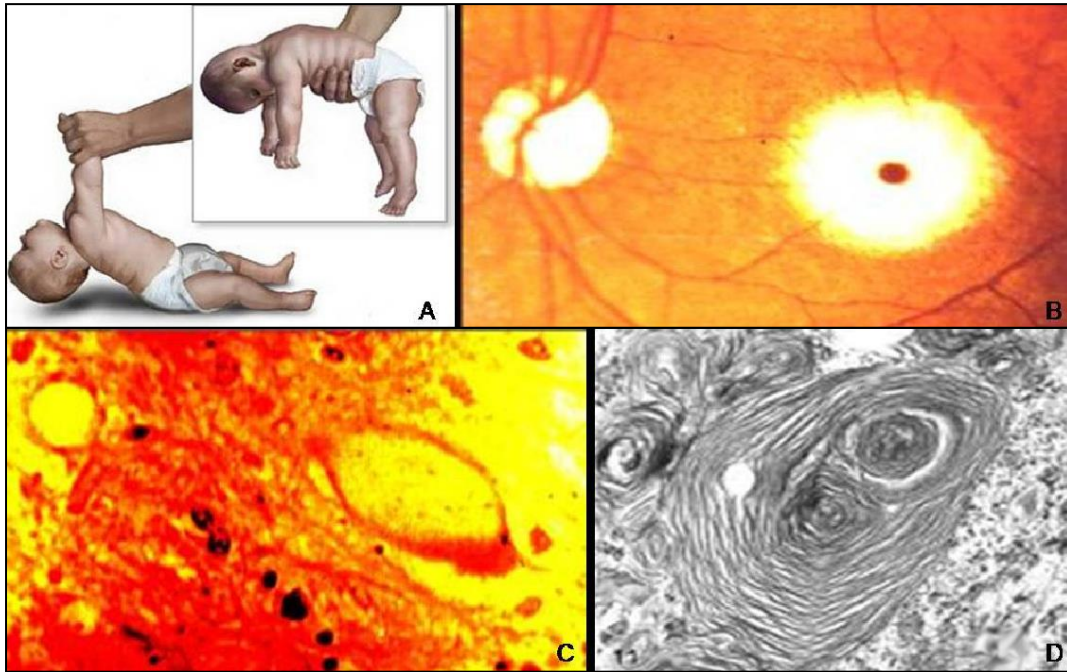
Figura 9. El sistema de las Hexosaminidasa y sus enfermedades asociadas. Adaptado de Gravel y col., 2001.

### 1.2.2 Manifestaciones clínicas en la enfermedad de Sandhoff

La ES se caracteriza por presentar un cuadro neurodegenerativo progresivo. Existen 3 formas clínicas principales, variantes Infantil, juvenil o adulta, que presentan distintas edades de inicio de síntomas y características diferenciales. Todas se heredan con un patrón autosómico recesivo.

En la variante infantil, los signos y síntomas comienzan aproximadamente entre los 6 y 9 meses de edad con hiperacusia, facies inexpresivas, pérdida de las adquisiciones motoras adquiridas, desconexión con el medio ambiente, ceguera precoz, deterioro motor y mental con progresiva debilidad e hipotonía (Fig. 10. A), mancha rojo cereza en la mácula de la retina (Fig. 10. B), convulsiones mioclónicas, desnutrición, estado caquéxico y finalmente evolución fatal entre el 2º y 3º año de vida. En algunos casos puede encontrarse también macrocefalia no constante, rigidez de descerebración, deformaciones óseas secundarias, hepatomegalia y anomalías cardíacas. Al microscopio óptico puede observarse como las neuronas se deforman debido al acúmulo de diversos glicoesfingolípidos y toman una “forma de balón” (Fig. 10. C). Al microscopio electrónico pueden verse inclusiones citoplasmáticas que tienen estructura similar a las catáfilas de cebolla y que son cuerpos membranosos ubicados en la región perinuclear (En inglés *membranous cytoplasmic bodies, MCBs*) (Fig. 10. D). Por otro lado, a causa del acúmulo de oligosacáridos, pueden detectarse tejidos PAS positivos y además, ya que estos azúcares son solubles también se pueden detectar por orina (Dodelson de Kremer y Molina de Levstein, 1980; Dodelson de Kremer et al., 1985, 1987; Oller Ramírez, 1996).

La variante juvenil presenta gran heterogeneidad clínica. Los primeros síntomas suelen aparecer entre los 2 y los 10 años comenzando con el desarrollo de ataxia y descoordinación. Durante el transcurso de la enfermedad los síntomas comunes son dificultades en la marcha, trastornos del lenguaje y el habla, falta de coordinación, deterioro psicomotor progresivo, retraso global en el desarrollo, discapacidad intelectual y signos piramidales. Otros síntomas menos frecuentes observados en estos pacientes fueron alteraciones psiquiátricas o de comportamiento, debilidad muscular, incontinencia urinaria



**Figura 10. Signos principales en la enfermedad de Sandhoff infantil.** Adaptado de Oller de Ramírez, 1996. A) Hipotonía muscular en un bebé enfermo. B) Imagen de fondo de ojo de un niño con ES. Se evidencia la mancha rojo cereza rodeada del acúmulo de glicolípidos. C) Fotografía tomada por microscopía óptica, 40 X. Neurona con forma de “balón” a causa del almacenamiento de glicosfingolípidos. D) Imagen obtenida por microscopía electrónica donde se observan los cuerpos membranosos citoplasmáticos.

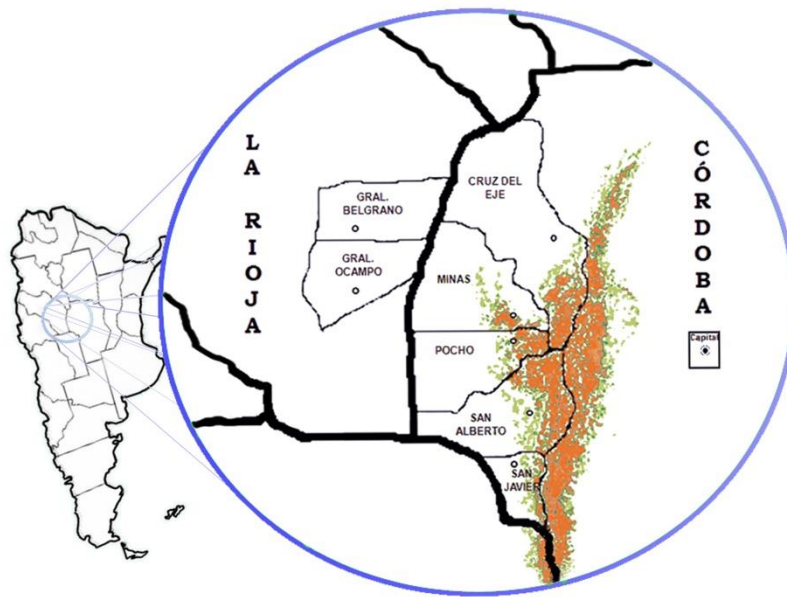
y/o fecal, deformidades del pie, disfagia, signos extrapiramidales, pobre ganancia de peso y disminución visual, no siendo frecuente la presencia de la mancha rojo-cereza en esta variante. Además, el curso de la enfermedad se caracteriza por el aumento de la espasticidad y el desarrollo de las convulsiones al final de la primera década de vida. La pérdida de la visión ocurre mucho más tarde que en la enfermedad infantil y la degeneración macular es variable. Por lo general, entre los 10 y 15 años de vida, el paciente se encuentra en estado vegetativo y fallece (Gravel et al., 2001; Hendriksz et al., 2004; Maegawa et al., 2006).

En la forma adulta, los primeros indicios de la enfermedad pueden aparecer desde la etapa juvenil hasta ya entrada la adultez. Esta variante se caracteriza por una extremada variabilidad clínica que puede cursar con deterioro psicomotor, distonía, pérdida progresiva de la visión, degeneración espinocerebelosa, alteraciones psiquiátricas y mentales, entre otras. Es frecuente que los enfermos presenten la enfermedad de la motoneurona,

caracterizada por una debilidad muscular progresiva, acompañada de fatiga, anormalidades esqueléticas secundarias y atrofia muscular espinal. También existen algunas formas adultas leves que son difíciles de detectar ya que presentan síntomas fácilmente confundibles con otras enfermedades como diarrea, debilidad y fatiga. En estos casos, la enfermedad es crónica y los pacientes llegan a vivir hasta la sexta o séptima década de la vida (Schnorf et al., 1995; Gomez-Brouchet et al., 1999; Gravel et al., 2001; Delnooz et al., 2010).

### 1.2.3 *Incidencia de la enfermedad de Sandhoff*

La ES fue reconocida con una alta prevalencia en diferentes grupos étnicos, destacándose la comunidad Metis en Saskatchewan, Canadá y la República Libanesa, donde se diagnosticaron 15 enfermos en un período de 22 años (Lowden et al., 1978; Der Kaloustian et al., 1981). Sin embargo, la mayor casuística registrada a nivel mundial es la identificada en la comunidad criolla del Valle de Traslasierra de Córdoba y los llanos de La Rioja, Argentina. Se estableció esa región como la zona de riesgo que comprende 5 departamentos de Córdoba: Cruz del Eje, Minas, Pocho, San Alberto y San Javier y los 2 correspondiente a La Rioja: General Belgrano y General Ocampo (Fig. 11) (Dodelson de Kremer y Molina de Levstein, 1980; Dodelson de Kremer et al., 1985; Dodelson de Kremer y Oller de Ramírez, 2003). Dicha zona está rodeada por cordones montañosos y durante centurias los pobladores de la región se mantuvieron aislados geográficamente. Sumado a esto, en esta comunidad son frecuentes los matrimonios consanguíneos lo que devino en una población con un fuerte componente endogámico. Estudios antropológicos indicaron que los enfermos tendrían una ascendencia criolla, es decir, resultante de la cruce entre nativos y españoles. Los nativos de la zona son los llamados “Comechingones” que se vieron sometidos a la conquista española a partir del siglo XVI (Lorca, 2008). En esta población la frecuencia de portadores fue estimada en 1 cada 16-29 individuos y la incidencia de enfermos de  $131 \times 10^{-5}$  (100.000 nacimientos), equivalente a 1 enfermo cada 763 recién nacidos. Todos los casos hasta la fecha pertenecen a la forma infantil de la enfermedad (Dodelson de Kremer et al., 1987; Oller Ramírez, 1996).



**Figura 11. Mapa de la zona de riesgo.** Se destacan los 5 departamentos de Córdoba y los 2 correspondientes a La Rioja (Adaptado de Kremer y col., 1987).

#### 1.2.4 Gen *HEXB* y mutaciones causantes de enfermedad de Sandhoff

*HEXB* (ENSG00000049860) es un gen de transcripción constitutiva ubicado en el cromosoma 5 humano, locus 5q13. Se organiza en 14 exones ocupando una región de aproximadamente 36,10 Kb. Se transcribe a un ARNm de 2,2 Kb, el cual luego es traducido en el polipéptido  $\beta$  que conforma las Hex (Wakamatsu et al., 1992; Mahuran, 1999; Fagerberg et al., 2014).

La ES y sus variantes son causadas por un grupo heterogéneo de mutaciones en el gen *HEXB* (Centre Universitaire de Santé McGill at Montréal, 2003; Zampieri et al., 2012; Gaignard et al., 2013; Tamhankar et al., 2016; Lee et al., 2017). Hasta la fecha hay registradas 59 variantes patogénicas en la base de datos *The Human Gene Mutation Database* (HGMD) (Institute of Medical Genetics Cardiff University, 2017). Las mutaciones más frecuentes a nivel mundial, son una delección de 16 Kb, una sustitución en posición +1 del intrón 2 y una variante en posición -26 del intrón 12 (O'Dowd et al., 1986; Nakano y Suzuki, 1989; Kleiman et al., 1994; Oller Ramírez, 1996).

La delección de 16 Kb abarca el promotor, los exones desde el 1 hasta el 5 y parte del intrón 5. Fue identificada en 17 pacientes con diversos orígenes

étnicos, entre ellos, suizo, alemán, danés, finlandés, holandés, inglés, francés, estadounidense afroamericano y francés canadiense (O'Dowd et al., 1986; Bikker et al., 1989, 1990; Neote et al., 1990; Bolhuis et al., 1993).

La mutación del intrón 2, una sustitución de un nucleótido G>A que afecta el sitio donador 5' (IVS2+1G>A, nomenclatura nueva c.445+1G>A) se describió en 62 pacientes (Brown et al., 1992; Kleiman et al., 1994; datos aún no publicados). Esta mutación produce un *splicing* aberrante que genera la pérdida del exón 2, produciendo un ARNm inestable no detectable por la técnica *Northern Blot* (Brown et al., 1992). Esta mutación se asocia con el fenotipo infantil de la enfermedad y solo ha sido identificada en pacientes argentinos (Kleiman et al., 1994; Oller Ramírez, 1996; Dodelson de Kremer y Oller de Ramírez, 2003).

La variante c.1509-26G>A ha sido identificada en 12 pacientes de diversos orígenes étnicos que presentaron la forma juvenil o adulta de la enfermedad (O'Dowd et al., 1986; Nakano y Suzuki, 1989; Dlott et al., 1990; Mitsuo et al., 1990; Maegawa et al., 2006; Delnooz et al., 2010; Gort et al., 2012; Huang et al., 2014). Se trata de un cambio intrónico, sustitución de guanina por adenina en posición -26 aguas arriba del exón 13 en el gen *HEXB*. Esta mutación provoca la creación de un nuevo sitio aceptor 3' que genera la inserción de 24pb entre los exones 12 y 13 del ARNm. La alteración en el *splicing* causa una reducción significativa en el porcentaje de ARNm normal producido, que resulta entre 2-4%. La proteína mutante resultante presenta una inserción de 8 aminoácidos entre las posiciones 491 y 492 (Nakano y Suzuki, 1989; Dlott et al., 1990).

#### 1.2.5 Diagnóstico de la enfermedad de Sandhoff

La existencia de síntomas clínicos y estudios complementarios positivos (fondo de ojo para detectar la mancha rojo cereza, detección de oligosacáridos en orina) permiten establecer el diagnóstico presuntivo de la ES. La confirmación del diagnóstico se realiza con la determinación de la actividad Hex en plasma, leucocitos o fibroblastos (Dodelson de Kremer et al., 1987; Oller Ramírez, 1996).

Los enfermos de Sandhoff tienen actividad Hex cero o actividad residual. Algunos autores mencionan que existe un valor crítico de actividad Hex, entre 5-10%, necesaria para que la cantidad de gangliósido GM2 hidrolizado sea equivalente a la cantidad de gangliósido que ingresa al lisosoma. Es decir, éste sería el nivel mínimo de función enzimática necesario para que no se acumule el gangliósido y se manifieste la enfermedad (Conzelmann et al., 1983; Mahuran, 1999).

Una vez identificado el paciente, la definición del estado de portador en los miembros de su familia es una herramienta fundamental para el correcto asesoramiento y planificación familiar a futuro. En estos casos, se realiza en primera instancia el análisis enzimático y luego, en los casos que se requiera, es posible confirmar con el estudio a nivel molecular.

#### 1.2.6 *Resultados previos en CEMECO*

Investigaciones a cargo de la Dra. Raquel Dodelson de Kremer, identificaron por primera vez la ES en nuestro medio y permitieron demostrar que esta enfermedad existe con alta prevalencia en la población argentina del Valle de Traslasierra y llanos de La Rioja (Dodelson de Kremer y Molina de Levstein, 1980; Dodelson de Kremer et al., 1985).

En un período aproximado de 40 años (a partir de la década de 1970 a fines del año 2011) se diagnosticaron 102 pacientes con la ES variante infantil, mayoritariamente provenientes de la zona de riesgo. El típico curso evolutivo que sigue esta enfermedad fue observado en todos los pacientes, desde los primeros síntomas hasta la etapa terminal caquéxica y fallecimiento (Dodelson de Kremer y Molina de Levstein, 1980; Dodelson de Kremer et al., 1985; Oller Ramírez, 1996; Dodelson de Kremer y Oller de Ramirez, 2003; Datos sin publicar).

En la década de 1990 se realizaron los primeros estudios a nivel molecular que identificaron a la mutación IVS2+1G>A (nomenclatura nueva: c.445+1G>A) como causante del 98,7% de los alelos mutados en los pacientes diagnosticados en CEMECO. También se identificó otra mutación, una delección de 4 nucleótidos en el exón 7 que produce un cambio en el marco de lectura,



originando un codón de terminación prematuro (nomenclatura anterior,  $\Delta$ CTTT782-785, nomenclatura nueva c.782\_785delCTTT; p.Ser261Cysfs\*13; Brown et al., 1992; Kleiman et al., 1994). Esta otra variante se encontró en el 1,3% de los alelos mutados, correspondiendo a un solo alelo en un enfermo. Estos datos sugirieron que la mutación c.445+1G>A se habría originado en las poblaciones nativas y correspondería a una mutación fundadora (Kleiman y col., 1994; Kleiman y col., 1998; Oller de Ramírez, 1996; Dodelson de Kremer y Oller de Ramírez, 2003).

A partir de los valores de actividad enzimática Hex en controles normales y en heterocigotas obligados (padres de niños confirmados con la ES) se estableció un patrón referencial autóctono para el fenotipo normal y el fenotipo portador o heterocigota (Tabla 4) (Dodelson de Kremer et al., 1987; Kleiman et al., 1994; Oller Ramírez, 1996). Desde el año 1985 se desarrollaron numerosos estudios poblacionales y un programa biomédico comunitario para la detección de portadores de la ES en la región de Traslasierra. Se llevaron a cabo determinaciones de la actividad Hex a partir de muestras de plasma y de pella leucocitaria en individuos provenientes de la zona de riesgo. (Tabla 4) (Dodelson de Kremer et al., 1987; Oller Ramírez, 1996).

**Tabla 4. Patrón referencial autóctono para la actividad de la Hexosaminidasa**

MUESTRA	HEX B			HEX TOTAL		
	Normal	Portador	Zona Gris	Normal	Portador	Zona Gris
Plasma <sup>a</sup>	140-600	50-200	140-200	400-1150	200-590	400-590
Leucocitos <sup>b</sup>	220-680	70-190	-	590-1370	200-690	-

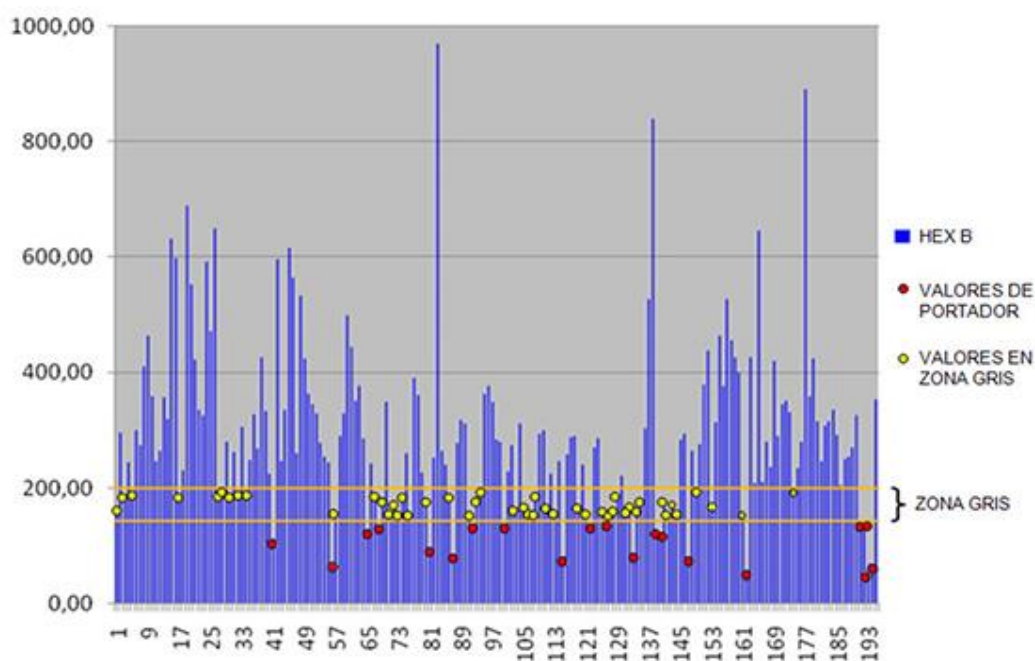
<sup>a</sup> Valores expresados en nmoles de sustrato consumido/ml plasma/hora

<sup>b</sup> Valores expresados en nmoles de sustrato consumido/mg proteína/hora

Según los valores obtenidos en el patrón referencial, se definen como heterocigotas a aquellos individuos cuya actividad Hex B en plasma es menor a 140 nmoles/mlplasma/hora. Las personas con valores Hex B mayores a 200 nmoles/mlplasma/hora se consideran normales (no portadores). La medición de la Hex a partir de plasma puede resultar en un rango de valores llamado “zona gris” donde se solapan los valores de individuos normales y portadores, no pudiéndose diferenciar entre ellos. Para la Hex B, este valor se encuentra entre

140-200 nmoles/ml plasma/hora y para la Hex Total entre 400-590 nmoles/ml plasma/hora y es considerado para la definición del estado de portador o heterocigota. La determinación enzimática a partir de pella leucocitaria no tiene solapamientos, sin embargo, es una técnica más compleja y de difícil aplicación en un muestreo poblacional (Tabla 4) (Oller Ramírez, 1996).

En el último muestreo poblacional realizado, entre los años 2007-2008, se determinó la actividad Hex en plasma en 200 muestras de individuos sanos provenientes de la zona de riesgo. Los valores obtenidos de actividad enzimática parcial (Hex B) y total (Hex T) revelaron la existencia presuntiva de 20 portadores enzimáticos y 49 individuos con valores en la “zona gris” (Fig. 12), datos aún no publicados.



**Figura 12. Valores enzimáticos obtenidos del muestreo poblacional 2007-2008.** Histograma que representa la actividad Hex parcial (Hex B) determinadas en las 200 muestras poblacionales de la zona de riesgo. La zona de solapamiento definida entre 140-200 nmoles/ml plasma/hora se encuentra delimitada por dos líneas anaranjadas.

Más recientemente, en el año 2010, se estableció un trabajo colaborativo entre la Dra. Ana María Oller de Ramírez, CEMECO, Cátedra de Clínica Pediátrica, Facultad de Ciencias Médicas, UNC, Hospital de Niños de Córdoba y la Dra. Andrea Dardis del Centro de Enfermedades Metabólicas del Hospital Universitario *Santa Maria della Misericordia* de Udine, Italia. El objetivo principal

fue investigar el gen *HEXB* completo en todos los pacientes con ES que hubiesen presentado previamente genotipo incompleto (c.445+1G>A/?) o desconocido (¿/?). En total, se estudiaron 5 pacientes que pertenecían a 5 familias sin relación filial de primer grado entre ellas, 3 provenientes de la zona de riesgo y 2 de Buenos Aires. Como resultado de esta investigación, se identificaron 3 cambios nuevos y 2 mutaciones ya descritas del gen *HEXB* (Tabla 5) (Zampieri et al., 2012).

**Tabla 5. Mutaciones identificadas en los pacientes argentinos investigados**

N°	MUTACIÓN		ORIGEN
	ALELO 1	ALELO 2	
I	c.445+1G>A	c.1451G>A, p.Gly484Glu	ZONA DE RIESGO
II	c.445+1G>A	c.1242+1G>A	
III	c.445+1G>A	c.1242+1G>A	
IV	c.1082+5G>A	c.1601G>A, p.Cys534Tyr	BUENOS AIRES
V	c.445+1G>A	c.1597C>T, p.Arg533Cys	

Las mutaciones nuevas están resaltadas en color rojo y las ya descritas en verde. En color negro se encuentra la mutación más frecuente identificada en nuestro medio.

Las variaciones genómicas nuevas fueron, por un lado, dos cambios intrónicos, uno en el intrón 10, c.1242+1G>A y otro en el intrón 8, c.1082+5G>A. Por otra parte, se identificó otro cambio de tipo *missense*, la sustitución de guanina por adenina en posición 1451 del exón 12 que ocasiona el cambio del aminoácido glicina por glutamina (c.1451G>A, p.Gly484Glu; Zampieri et al., 2012).

Las mutaciones ya descritas son de tipo *missense*: una identificada en un paciente de origen japonés, donde se produce la sustitución de guanina por adenina en posición 1601 del exón 13 que provoca el cambio de cisteína por tirosina (nomenclatura nueva c.1601G>A, p.Cys534Tyr; nomenclatura anterior 1565G>A, p.Cys522Tyr) (Kuroki et al., 1995; Sakuraba et al., 2002; Utsumi et al., 2002). La otra mutación, c.1597C>T, p.Arg533Cys, fue descrita en un paciente de origen árabe. En este caso se produce la sustitución de citosina por timina en posición 1597 del exón 13 que produce el cambio de arginina por cisteína (Kaya et al., 2011).

### 1.2.7 *Perspectivas terapéuticas para las Enfermedades de almacenamiento lisosomal y la enfermedad de Sandhoff*

Existen numerosas investigaciones en curso para el tratamiento de las enfermedades de almacenamiento lisosomal, incluso algunos ya se encuentran en uso. Algunos de estos enfoques terapéuticos son: terapia de reemplazo enzimático (TRE), trasplante de médula ósea, terapia génica, terapia de células modificadas genéticamente, utilización de células madres, terapia farmacológica como tratamiento con chaperonas, privación de sustrato, el uso de inhibidores de receptores específicos, supresión de codones de terminación prematuro (en inglés *readthrough*), uso de antioxidantes y antiapoptóticos y tratamientos inmunológicos (Cox y Cachón-González, 2012; Cox, 2015; Parenti et al., 2015a; Coutinho et al., 2016)

Una de las enfermedades lisosomales que ya tiene un tratamiento exitoso y cuyo uso está aprobado por la FDA desde 1991, es la enfermedad de Gaucher Tipo I. Originalmente se utilizó la enzima específica glucocerebrosidasa purificada de placenta y colocada en vía endovenosa, luego se comenzó a administrar una enzima modificada con un receptor fosfomanosa que le permite a la enzima ingresar dentro del lisosoma y así aumentar su efectividad. También existen otras enfermedades lisosomales a las que se trata con TRE, estas son: Fabry, Pompe y varios tipos de Mucopolisacaridosis (MPS) como MPS I, MPS VI, MPS II y en Trials humanos MPS IV, MPS VII y MPS III, y finalmente la forma tipo 2 Lipofuscinosis Ceroidea Neuronal. Por otra parte, es posible tratar pacientes con la enfermedad de Niemann-Pick tipo C con el uso de chaperonas y terapia de reducción de sustrato. Finalmente, para la enfermedad de Gaucher tipo 3, Leucodistrofia Metacromática y algunas otras patologías se realiza el trasplante de médula ósea con resultados favorables (Hollak y Weinreb, 2015; Parenti et al., 2015a; Santos-Lozano et al., 2015; Coutinho et al., 2016; Zimran et al., 2017).

En los últimos años, la terapia génica volvió a retomar impulso gracias a la utilización de virus adenoasociados (en inglés, *adeno-associated virus, AAV*) como vectores. Estos tienen la ventaja que, a diferencia de otros virus, se

integran en el genoma humano en un sitio específico, el cromosoma 19. Otra ventaja que poseen es que no causan enfermedades en humanos, no son inmunogénicos y algunos tienen la capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica. Su principal limitación en el presente es que los vectores son difíciles de manipular y producir en grandes cantidades, y además, necesitan otros virus durante la coinfección (Walia et al., 2015; Ye et al., 2015; Bosch et al., 2016; Belur et al., 2017; Robert et al., 2017). También, algunos reportes indican ciertos niveles de toxicidad y un posible efecto oncogénico (Russell y Grompe, 2015; Berns y Muzyczka, 2017).

Particularmente para la ES aún no existe tratamiento específico, siendo la única opción el cuidado paliativo del enfermo. Sin embargo están en investigación diferentes enfoques terapéuticos, como la producción de enzimas recombinantes (Matsuoka et al., 2010, 2011), deprivación de sustrato mediante la administración de Miglustat® en pacientes juveniles y adultos (Masciullo et al., 2010; Villamizar-Schiller et al., 2015) y la utilización de chaperonas químicas (Chiricozzi et al., 2014; Parenti et al., 2015b). Más recientemente, ensayos de terapia génica con vectores de virus adenoasociados han obtenido resultados favorables en modelos animales (McCurdy et al., 2015; Osmon et al., 2016; Bradbury et al., 2017).

### 1.3 ENSAYOS *IN VITRO*

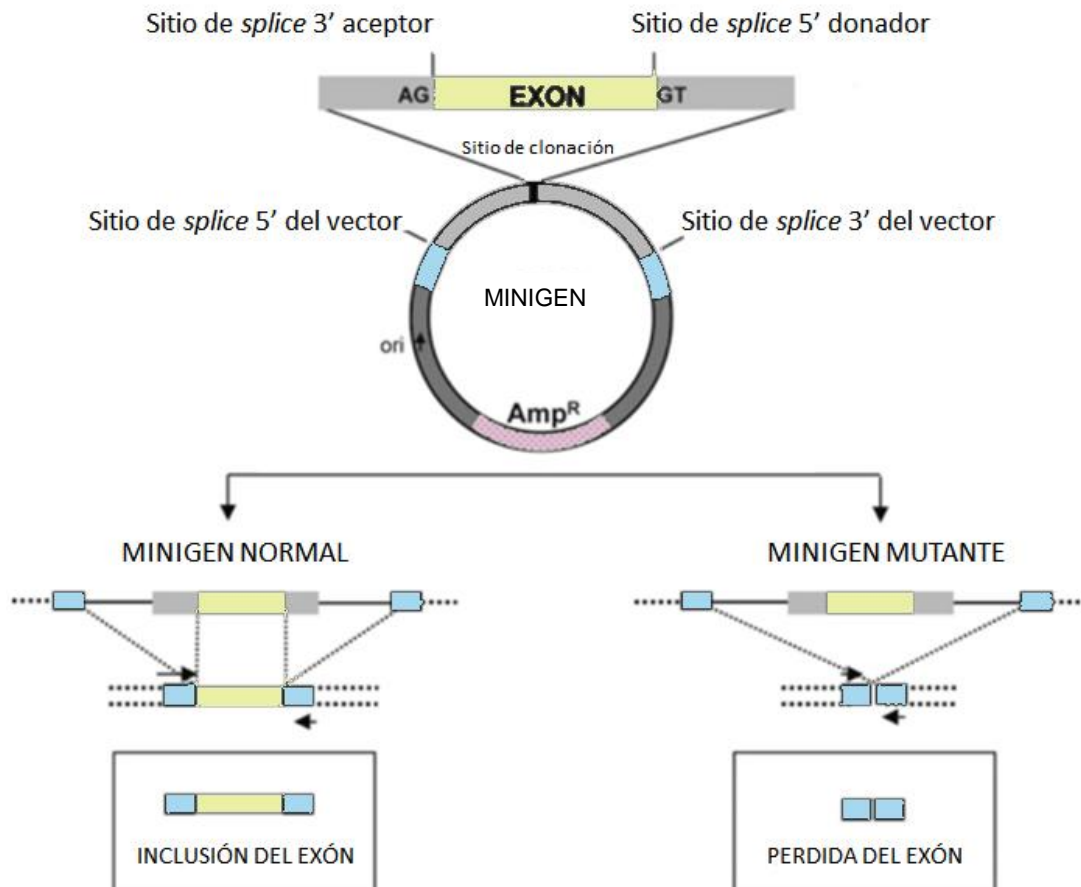
Los ensayos *in vitro*, así como los estudios en modelos animales, forman parte de una etapa inicial de investigación en la que se evalúan nuevos fármacos y tratamientos terapéuticos. Cabe destacar su importancia, ya que sientan las bases para etapas posteriores de investigación a nivel clínico y la posible aplicación del tratamiento en pacientes (Walker, 2004; Gupta y Villalón, 2010).

#### 1.3.1 *El uso de minigenes como modelos funcionales*

El uso de modelos celulares de splicing es una herramienta muy útil en el campo de la biología molecular y el diagnóstico genético. Dentro de sus ventajas se encuentran su simplicidad, bajo costo y fácil manipulación (Cooper, 2005; Pagani y Baralle, 2010; Desviat et al., 2012). Se utilizan, entre otras cosas, para caracterizar variaciones en el ADN que afectan el procesamiento de corte y empalme (o *splicing* en inglés), como mutaciones en regiones intrónicas 5', 3' o zonas alejadas de las regiones codificantes. También son útiles para el análisis de *splicing* alternativo y para la detección de elementos reguladores que participan en este proceso (Pagani y Baralle, 2010).

Los minigenes, en particular, son herramientas utilizadas para generar vectores específicos que sirvan de modelos *in vitro* de una variante génica específica. Comparando los modelos mutados y normales, es posible analizar funcionalmente el efecto de las variantes sobre el procesamiento del ARNm (Cooper, 2005; Pagani y Baralle, 2010; Desviat et al., 2012).

Estos vectores contienen porciones exónicas con sitios donadores y aceptores de splicing potentes, separados por una secuencia intrónica en cuyo interior hay un sitio de policlonación donde se puede introducir la secuencia a analizar. Una vez clonada la secuencia normal, se introducen las mutaciones y se evalúa el efecto funcional de la misma, el cual puede generar la inclusión o pérdida, parcial o total, del exón insertado (Fig. 13) (Dujardin et al., 2011; Desviat et al., 2012).



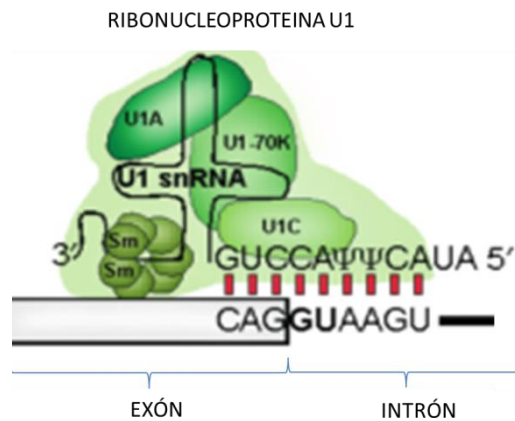
**Figura 13. Representación esquemática del funcionamiento de un minigen.** En color amarillo se encuentra representada la porción exónica que se introducirá en el vector, en celeste se destacan los sitios de splice 5' y 3' propios del vector, y en rosado, la porción que corresponde al gen que le otorga resistencia y que permite seleccionar los clones (Adaptado de Desviat et al., 2012).

### 1.3.2 Tratamiento con variantes de ribonucleoproteínas U1

Las ribonucleoproteínas son biomoléculas formadas por una parte proteica y una de ARN. Su función en la célula es participar en el procesamiento del ARNm reconociendo por complementariedad de bases a la porción 5' de las secuencias intrónicas (Fig. 14) (Havens et al., 2013). Como estrategia terapéutica, se generan ribonucleoproteínas modificadas, adaptando la porción de ARN, llamada U1snRNA, de manera que estas puedan actuar sobre ARNm mutados. El objetivo del uso de estas variantes de U1snRNA es

restaurar el procesamiento normal de los ARNm alterados, ya sea de modo parcial o total.

Si bien para esta estrategia aún no se han realizado ensayos a nivel clínico, resulta prometedora ya que se han obtenido resultados favorables en ensayos *in vitro* para algunas mutaciones causantes de Hemofilia, Retinitis Pigmentosa, Atrofia Muscular Espinal y Acidemia Propiónica. En estos casos, fue posible restaurar a nivel *in vitro*, el proceso de corte y empalme alterado por mutaciones en posición +3 y +5 (Sánchez-Alcudia et al., 2011; Alanis et al., 2012).



**Figura 14. Ilustración de la ribonucleoproteína U1.** Pueden observarse las porciones proteicas, U1A, U170K, U1C y Sm, y la porción de ARN, U1 snRNA que se une por complementariedad de bases a la última parte del exón y el sitio 5' donador de cada intrón (Adaptado de Havens et al., 2013).



## 1.4 OBJETIVOS DE ESTE TRABAJO DE TESIS

### *OBJETIVOS GENERALES*

- Contribuir a la caracterización molecular de los genes *HEXB* y *CFTR* e integrarlo al estudio multidisciplinar de las enfermedades de Sandhoff y fibrosis quística, desde una perspectiva que abarque desde el genoma al fenoma.
- Aportar un mayor entendimiento de los mecanismos moleculares implicados en los ensayos *in vitro* con ribonucleoproteínas modificadas y en la terapia antisentido, valorando su uso como forma de terapia posible para pacientes con enfermedad de Sandhoff.

### *OBJETIVOS ESPECÍFICOS*

- Actualizar el espectro de mutaciones y polimorfismos en los genes *HEXB* y *CFTR* en Argentina, con fines de diagnóstico, de asesoramiento familiar y evaluar las implicancias para futuros enfoques terapéuticos.
- Investigar las mutaciones causantes de enfermedad de Sandhoff (c.1082+5G>A, c.1242+1G>A, p.Gly484Glu, p.Arg533Cys y p.Cys534Tyr) en 200 muestras poblacionales.
- Generar minigenes que puedan ser útiles como modelos de mutaciones intrónicas específicas asociadas a la enfermedad de Sandhoff
- Diseñar y generar constructos del gen de la U1snRNA normales y mutados para aplicar en modelos de mutaciones intrónicas específicas para la enfermedad de Sandhoff.
- Aplicar el tratamiento con variantes de U1snRNA en los modelos *in vitro* de enfermedad de Sandhoff.

## **2 MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2.1 Principios éticos**

Todos los procedimientos seguidos fueron realizados en concordancia con la última revisión de la Declaración de Helsinki y la Declaración Universal de Bioética y Derechos Humanos-UNESCO, 2005. El proyecto de investigación siguió las normas bioéticas para realizar el estudio basado en pacientes aprobado por el Comité Interinstitucional de Ética de la Investigación en Salud (CIEIS), inscripto en el Registro Provincial de Investigación en Salud (REPIS, Ministerio de Salud, Provincia de Córdoba). También se cuenta con la aprobación de un consentimiento informado para participar del proyecto de investigación y autorización para divulgar información médica.

### **2.2 Diagnóstico molecular de la fibrosis quística**

#### *2.2.1 Sujetos*

El estudio molecular para FQ se realizó en 3 grupos de pacientes:

Grupo A: 12 pacientes que ingresaron a CEMECO en el periodo 2001-2008. Entre ellos, 9 presentaron fenotipo clásico, 2 fueron diagnosticados con CBAVD, y 1 paciente presentó síntomas clínicos sugestivos de *CFTR*-RD (Tabla 6). Estos pacientes ya tenían estudios moleculares previos realizados en CEMECO y en el Centro de Genética Médica y Molecular, IRO-IDIBELL, Hospital Durán i Reynals, Barcelona, España. Los análisis previos incluían las 29 mutaciones más frecuentes y la investigación del gen *CFTR* completo por análisis conformacional de hebra simple y electroforesis en gel de gradiente desnaturizante (SSCA y DGGE, siglas en inglés) con secuenciación posterior de los exones con patrón alterado. En todos los casos seleccionados el genotipo de los pacientes resultó incompleto (se detectó una única mutación en heterocigosis) o desconocido (no se detectó ninguna mutación), razón por la cual se continuó con su estudio en el presente trabajo de Tesis (Tabla 7).

Tabla 6. Características clínicas principales de los pacientes con fibrosis quística

GRUPO	PACIENTE	AÑO	SEXO	EDAD	FENOTIPO	TEST SUDOR	PRINCIPALES SINTOMAS		
							ENFERMEDAD SINOPULMONAR CRONICA	GASTROINTESTINALES y NUTRICIONALES	OTROS
A	FQ-A1	2001	F	6 a	Clásico	(+)	S/D	S/D	NP
	FQ-A2	2001	F	15 a	Clásico	(+)	S/D	NP	NP
	FQ-A3	2001	M	12 a	Clásico	(+)	Infecciones, <i>Staphylococcus</i>	Insuficiente pancreático	NP
	FQ-A4	2002	M	2 m	Clásico	(+)	S/D	Íleo meconial	NP
	FQ-A5	2003	F	20 a	CFTR-RD	INT, (-)	Sinusitis, bronquiectasias, <i>Pseudomonas sp.</i>	Bajo peso	Infertilidad
	FQ-A6	2006	M	2 m	Clásico	(+)	S/D	Insuficiente pancreático	NP
	FQ-A7	2007	F	29 a	Clásico	(+)	Bronquiectasias	NP	NP
	FQ-A8	2007	M	29 a	Clásico	(+)	Bronquiectasias, <i>Pseudomonas sp.</i>	Insuficiente pancreático	NP
	FQ-A9	2007	M	28 a	CBAVD	(-)	Pólipos nasales, sinusitis	NP	Azoospermia
	FQ-A10	2007	M	50 a	CBAVD	S/D	Tos, bronquiectasias	NP	Infertilidad
	FQ-A11	2008	M	8a	Clásico	(+)	S/D	S/D	NP
	FQ-A12	2008	F	1 a	Clásico	(+)	S/D	S/D	NP
B	FQ-B1	2015	F	13 a	Clásico	(+)	Bronquiolitis, Infecciones, <i>Burkholderia sp</i>	Baja talla, bajo peso, Insuficiente pancreático	NP
	FQ-B2	2015	M	1 m	Clásico	(+)	Bronquitis, tos	Constipación, Insuficiente pancreático	NP
	FQ-B3	2015	M	7 a	CFTR-RD	INT, (-)	Tos, asma, bronquiolitis	Bajo peso	S/D
C	FQ-C1	2000	F	2 a	Clásico	(+)	<i>Pseudomonas sp.</i>	Insuficiente pancreático	NP
	FQ-C2	2000	M	12 a	Clásico	(+)	S/D	Insuficiente pancreático	NP

\* Resultados Test del Sudor: (-) = Valores normales  $\leq 29$  mmol/L; INT= Valores intermedios = 30-59 mmol/L; (+) = Valores patológicos  $\geq 60$  mmol/L.

Comunicación personal, Bioq. Myrna Melano de Botelli.

\*\* CFTR-RD = Enfermedades relacionadas al gen CFTR; CBAVD = Agenesia bilateral congénita de conductos deferentes; S/D= Sin datos; NP=No presentó

**Tabla 7. Mutaciones previamente identificadas en pacientes con fibrosis quística**

GRUPO	PACIENTE	FENOTIPO	GENOTIPO	
A	FQ-A1	Clásico	c.1521_1523delCTT (F508del)	?
	FQ-A2	Clásico	c.1521_1523delCTT (F508del)	?
	FQ-A3	Clásico	?	?
	FQ-A4	Clásico	c.1521_1523delCTT (F508del)	?
	FQ-A5	CFTR RD	?	?
	FQ-A6	Clásico	?	?
	FQ-A7	Clásico	?	?
	FQ-A8	Clásico	c.1521_1523delCTT (F508del)	?
	FQ-A9	CBAVD	c.3454G>C (D1152H)	?
	FQ-A10	CBAVD	c.1657C>T (R553X)	?
	FQ-A11	Clásico	?	?
	FQ-A12	Clásico	c.2657+5G>A (2789+5G>A)	?
C	FQ-C1	Clásico	c.1521_1523delCTT (F508del)	<b>c.829T&gt;A (W277R)</b>
	FQ-C2	Clásico	c.1521_1523delCTT (F508del)	<b>c.79G&gt;A (G27R)</b>

\* La nomenclatura utilizada para las mutaciones es la actual y entre paréntesis se encuentra la tradicional.

\*\* En rojo y negrita se destacan las variantes con efecto desconocido.

\*\*\* El signo “?” significa alelo desconocido.

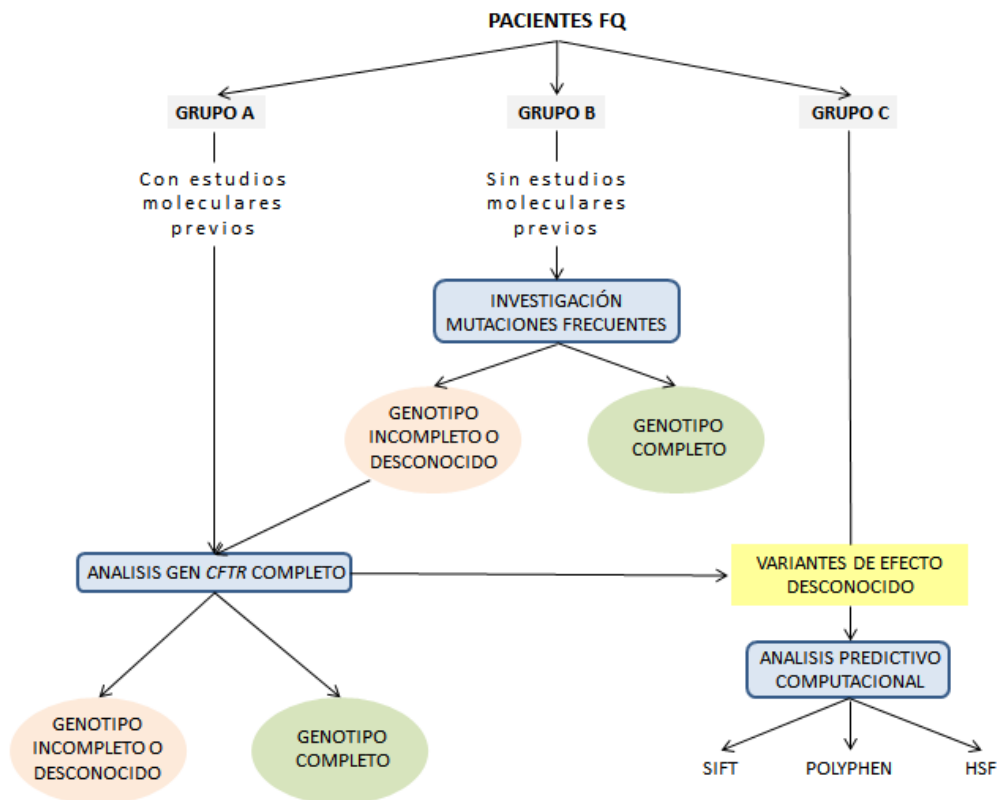
Grupo B: 3 pacientes derivados por el Servicio de Neumonología del Hospital de Niños en el año 2015 sin ningún tipo de estudio molecular previo. Dos de ellos presentaron fenotipo clásico y 1 presentó síntomas asociados a *CFTR*-RD (Tabla 6).

Grupo C: 2 pacientes con diagnóstico de FQ clásico que ingresaron a CEMECO en el año 2000 (Tabla 6). En ese momento, se les investigó el gen *CFTR* por técnica de SSCA/DGGE y posterior secuenciamiento y se identificaron 2 variantes con efecto desconocido en combinación con la mutación F508del (Tabla 7) (Oller Ramírez et al., 2006).

### 2.2.2 Estrategia diagnóstica

A cada grupo de estudio se le aplicó una estrategia diagnóstica diferente (Fig. 15). A los pacientes del grupo A, que tenían estudios moleculares previos,

se les analizó los 27 exones y regiones flanqueantes del gen *CFTR* mediante amplificación por PCR y secuenciación. En los del grupo B, que no tenían estudios previos, se comenzó con el análisis de 10 exones (4, 8, 11, 12, 13, 16, 20, 21, 23, 24) donde se encuentran las mutaciones causantes de FQ más frecuentes (F508del, N1303K, G542X, G551D, 2789+5G>A, R553X, W1282X, 1717-1G>A, R117H, 621+1G>T, R334W, 1898+1G>A, R347P, D1152H). En una segunda etapa, en aquellos pacientes que continuaron con genotipo desconocido o incompleto, se secuenció el resto de los 27 exones del gen *CFTR*. Finalmente, tanto en los pacientes del grupo C, que presentaron variantes con efecto desconocido, como las variantes nuevas o desconocidas detectadas en los grupos B y C por secuenciamiento, fueron analizadas mediante métodos bioinformáticos predictivos a fin de valorar la alteración fenotípica producida.



**Figura 15. Algoritmo de trabajo para el diagnóstico molecular en pacientes con fibrosis quística.**

### 2.2.2.1 Extracción de ADN

Se extrajo ADN genómico a partir de sangre entera con EDTA 0,1M en una proporción 1/10 de acuerdo al protocolo del fabricante (Wizard® DNA Purification Kit-Promega).

### 2.2.2.2 Diseño de oligonucleótidos

Para el diseño de cebadores se utilizó el software PRIMER 3 (Untergasser et al., 2012). Las secuencias de nucleótidos obtenidas permitieron posteriormente la amplificación de cada uno de los 27 exones, más las secuencias consenso de corte y empalme y parte de las regiones no traducidas UTR 5' y 3' del gen *CFTR* (Tabla 8).

**Tabla 8 (parte 1). Secuencia de los cebadores utilizados en la amplificación del gen *CFTR***

<b>CEBADOR</b>	<b>REGION</b>	<b>SECUENCIA (5' – 3')</b>	<b>TAMAÑO PRODUCTO</b>
CFTR_U5'-1F CFTR_U5'-1R	UTR 5' - EXÓN 1	GAAGGAGGGTCTAGGAAGCTCT CTTTTCAGTTGCAAGTAGATGTGG	823
CFTR_2F CFTR_2R	EXÓN 2	CCTGTAAGAGATGAAGCCTGGTAT TTTAGAGAGAGAGGGTTTTGCTGT	671
CFTR_3F CFTR_3R	EXÓN 3	ATATCTGGCTGAGTGTGGTGT AGGTGGTTTTCTTAGTGTGGAGT	418
CFTR_4F CFTR_4R	EXÓN 4	ACTTGTCTCCCACTGTTGCTATAA AGAGGCAGTTTACAGAAGATACTCAA	652
CFTR_5F CFTR_5R	EXÓN 5	CTGGGAAATAAAACAAGTAGAAGCA TATTATCTGACCCAGGAAAACCTCC	398
CFTR_6F CFTR_6R	EXÓN 6	GTCCCTGGAGAGAGTTCCTTGT GCATAGAGCAGTCCTGGTTTTACT	619
CFTR_7F CFTR_7R	EXÓN 7	AAATAGAGATACCCACCGCTCA AAACTACAGCCCATGAAAGTGAA	563
CFTR_8F CFTR_8R	EXÓN 8	GGAGCCAGGTTAAAAATATAGGC ACTGTCCAGAGAAATGCTAGGAA	560
CFTR_9F CFTR_9R	EXÓN 9	GGGTTGCTTTGTAAATTCATCAC TCTAATTTTATTCGCCATTAGGATG	500
CFTR_10F CFTR_10R	EXÓN 10	CATGTCCTCTAGAAACCGTATGC AAGATACAGTGTGAATGTGGTGC	625
CFTR_11F CFTR_11R	EXÓN 11	CCCTTGATCTTTTGTGCATAGC TCACAGTAGCTTACCCATAGAGGA	509

**Tabla 8 (parte 2). Secuencia de los cebadores utilizados en la amplificación del gen CFTR**

<b>CEBADOR</b>	<b>REGION</b>	<b>SECUENCIA (5' – 3')</b>	<b>TAMAÑO PRODUCTO</b>
CFTR_12F CFTR_12R	EXÓN 12	AACTGTGGTTAAAGCAATAGTGTGA TGAGGCAAACAAATACACTGACA	458
CFTR_IN12F CFTR_IN12R	INTRÓN 12	TTTTAAAGTTTTGCCATTGGTTTT TTGCATTTTGTTCCTTGTAGTTTC	410
CFTR_13F CFTR_13R	EXÓN 13	GTTCTTGAATGTTGTGAAAAGTG AACAGTATAGCAATGAGAGAACTGG	585
CFTR_14F CFTR_14R	EXÓN 14	AAATGCTAAAATACGAGACATATTGC CATGCTACATATTGCATTCTACTCAA	868
CFTR_15F CFTR_15R	EXÓN 15	TGGCTATAGAATGACATCATACATG ACATCCCCAACTATCTTAATTTAACT	361
CFTR_16F CFTR_16R	EXÓN 16	CTGTGATCTTGGCTTTCTTGTG CCTGTGGAGGAGCTAGGACTAC	547
CFTR_17F CFTR_17R	EXÓN 17	TAAGGGTGCATGCTCTTCTAAT GGCCTTCTTGTCTGCTACAGT	641
CFTR_18F CFTR_18R	EXÓN 18	TTAGAATGTTTGGAAAGAAACAAAA GACAGGACTTCAACCCTCAATC	361
CFTR_19F CFTR_19R	EXÓN 19	TCACTGACACACTTTGTCCACTT TGATGTAAAAGTTTAAAAGCAGAATTT	334
CFTR_20F CFTR_20R	EXÓN 20	TAAGTTCCCATCTCTGGTAGCC TGGAATTCAAAGAAATCACTTG	612
CFTR_21F CFTR_21R	EXÓN 21	TAAAAGGGCAACACTTTCCTAATA GACAGATACACAGTGACCCTCAA	499
CFTR_22F CFTR_22R	EXÓN 22	ATTGAAAAGCCCGACAAATAAC GATTCTGCTAACACATTGCTTCA	468
CFTR_IN22F CFTR_IN22R	INTRÓN 22	GCAGCATATTCTCAATACTATGTTTCA CGCAAATAAGCTTTTAAGACATACC	378
CFTR_23F CFTR_23R	EXÓN 23	CAACATTGGTCAGGATTGAAAG TGCCTATGAGAAAAGTCACTG	481
CFTR_24F CFTR_24R	EXÓN 24	ATGTTACAAGGGACTCCAAA TTAGGGGTAGGTCCAGTCAAAA	493
CFTR_25F CFTR_25R	EXÓN 25	AATTCAAATGGTGGCAGGTAGT TTCCACTGGGCAATTATTTTCAT	459
CFTR_26F CFTR_26R	EXÓN 26	CATGGTTGAAAAGCTGATTGTG TGAGTAAAGCTGGATGGCTGTA	415
CFTR_27-U3'F CFTR_27-U3'R	EXÓN 27 – UTR 3'	TCTGGACATTGCATTCTTTGAC CTTAATTCATCCTTGTCTTCTGAGG	439

### 2.2.2.3 Amplificación génica

Los fragmentos génicos de interés se amplificaron mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que se realizó a partir de 250-500ng de ADN, buffer Promega 5X, 200 uM de cada deoxinucleótido (dNTPs, Amersham), 50 pmol de cada cebador y 1.5 unidades de TaqGO polimerasa (Promega), en un volumen final de 50 ul. La reacción se llevó a cabo a través de 35 ciclos, comenzando con un tiempo de desnaturalización previa de 5' a 94°C y luego cada uno de los ciclos consistió en 30'' de desnaturalización a 94°C, 40'' de hibridación a 58°C, 1' de extensión a 72°C y por último una extensión final de 5' a 72°C. Los productos de amplificación fueron separados por electroforesis en gel de agarosa al 1% (Amersham, GE) con Bromuro de Etidio 0,5mg/ml y se visualizaron utilizando un transiluminador UV (UVP).

### 2.2.2.4 Purificación y secuenciación de los productos amplificados

Los productos de PCR se aislaron utilizando un kit de purificación ILLUSTRATE GFX PCR DNA (GE) y se secuenciaron por el método de Sanger en un secuenciador ABI 3100XL. Los electroferogramas fueron analizados utilizando el software Chromas 2.6.2 (Technelysium Pty., Australia).

### 2.2.2.5 Análisis predictivo computacional para variantes génicas con efecto fenotípico desconocido

A fin de realizar predicciones sobre el efecto de los cambios encontrados en el ADN se llevó a cabo un análisis utilizando 3 programas bioinformáticos.

#### SORTING INTOLERANT FROM TOLERANT (SIFT):

Dirección página web: <http://blocks.fhcrc.org/sift/SIFT.html>. Esta herramienta predice si la sustitución de un aminoácido afecta la función de la proteína basándose en la homología de la secuencia y las propiedades físicas de los aminoácidos. El valor denominado "Seq Rep" es la fracción de secuencias que contiene uno de los aminoácidos básicos. Una fracción baja indica que la posición no es alineable y posee poca información; se espera una predicción pobre en estas posiciones. SIFT puede ser aplicado a polimorfismos



no sinónimos y a mutaciones de sentido erróneo. Esta herramienta ordena las sustituciones de intolerantes a tolerantes, clasificándolas como toleradas o deletéreas (Ng y Henikoff, 2003; Kumar et al., 2009).

#### POLYMORPHISM PHENOTYPING-2 (POLYPHEN):

Dirección página web: <http://genetics.bwh.harvard.edu.html>. PolyPhen es una herramienta que predice el posible impacto de la sustitución de un aminoácido sobre la estructura y función de una proteína humana, usando consideraciones físicas directas y comparativas. Utiliza ocho características predictivas basadas en secuencias y tres basadas en la estructura. La mayoría de estas características involucran comparaciones de las propiedades del modelo salvaje (ancestral, normal) con las del alelo mutante (derivado, causante de enfermedad). Las mutaciones son valoradas cualitativamente como benignas/posiblemente perjudiciales/probablemente perjudiciales sobre la base de la tasa de los falsos positivos del modelo. Si la falta de información no permite hacer una predicción el resultado es reportado como desconocido. El programa ofrece dos modelos de predicciones: *HumDiv*, es el preferido para evaluar alelos raros, la cartografía de regiones densas identificadas por estudios genómicos y el análisis de la selección natural; *HumVar* es el método preferido para enfermedades mendelianas que requieren distinguir las mutaciones con efectos drásticos del resto de las variaciones humanas, incluyendo los alelos deletéreos medianamente abundantes (Ramensky et al., 2002; Adzhubei et al., 2010).

#### HUMAN SPLICING FINDER 3.0 (HSF):

Dirección página web: <http://www.umd.be/HSF3/HSF.html>. Este programa combina 12 algoritmos diferentes para reconocer los sitios de corte y empalme en 3' y 5' y predecir el efecto de variantes sobre este proceso. También permite identificar los sitios exónicos potenciadores y represores (En inglés, Exonic Splicing Enhancers [ESE] y Exonic Splicing Silencers [ESS]). Los algoritmos utilizados por este software están basados en Matrices de Peso Posicionales (En inglés, PWM), en el Principio de Máxima Entropía y en Métodos de Reconocimiento de Motivos. El programa asigna valores entre 0 y

100, tanto para la secuencia normal como para la mutada, y establece el valor 65 como umbral. Valores por encima de 65 se asocian a sitios que intervienen en el proceso de corte y empalme (Desmet et al., 2009).

## **2.3 Diagnóstico bioquímico y molecular de la enfermedad de Sandhoff**

### *2.3.1 Sujetos*

Se estudiaron 34 pacientes con sospecha de Gangliosidosis GM2 que ingresaron a CEMECO durante el periodo de abril 2012 a diciembre 2016. Veinte de ellos ingresaron con sospecha de Gangliosidosis GM2 variante infantil, 9 de forma juvenil y 5 de la adulta (Tabla 9).

También se incluyeron en este trabajo 2 pacientes con diagnóstico confirmado de ES que fueron derivados de otros centros médicos para su estudio a nivel molecular.

Paciente ES-6, ES variante infantil: Ingresó a CEMECO en septiembre de 2014 derivado del Hospital Notti, Mendoza. Sexo femenino, 1 año y 8 meses, oriunda de Mendoza capital, hija única de una pareja sana, no consanguínea, sin antecedentes de importancia. Familia materna originaria de Mendoza y paterna de Parma, Italia. No refieren parentesco con la población de Traslasierra de Córdoba. Presentó un cuadro neurodegenerativo progresivo, pérdida de habilidades motoras adquiridas, hipotonía, espasmos ante estímulos sonoros, convulsiones, mancha rojo-cereza en retina. Se le realizaron estudios bioquímicos en Buenos Aires que confirmaron la deficiencia de la enzima Hex.

Paciente ES-8, ES variante infantil: Ingresó a CEMECO en febrero de 2016 derivado del Hospital Nacional Posadas, Buenos Aires. Sexo femenino, 1 año, oriunda de Morón, Buenos Aires, segunda hija de una pareja sana, consanguínea (primos en 2do grado), sin antecedentes de importancia. Madre y padre nacidos en provincia de Bs As. No se cuenta con información acerca de posible relación con la población de Traslasierra de Córdoba. Presentó hipotonía con crisis epiléptica casi permanente, conducta visual amaurótica y espasmos en flexión ante estímulos sonoros. Deficiencia de la enzima Hex confirmada.

**Tabla 9. Resumen pacientes con sospecha clínica de gangliosidosis GM2**

<b>VARIANTE SOSPECHADA</b>	<b>Nº</b>	<b>FECHA INGRESO</b>	<b>S</b>	<b>EDAD</b>	<b>SINTOMAS PRINCIPALES</b>
<b>INFANTIL</b>	1	04/2012	M	3 m	Retraso madurativo, opistótonos
	2	09/2012	F	1 a 1 m	Hipotonía, pérdida de habilidades motoras adquiridas
	3	12/2012	F	8 m	Síndrome convulsivo, retraso psicomadurativo
	4	06/2013	M	8 m	S/D
	5	06/2013	F	1 a 2 m	Encefalopatía progresiva
	6	09/2013	M	1 a 5 m	Síndrome convulsivo, retraso psicomadurativo
	7	03/2014	M	1 a 2 m	Hipotonía, convulsiones, broncoespasmos
	8	08/2014	M	1 a 2 m	Retraso madurativo, hipotonía, lesiones sust. blanca
	9	09/2014	M	5 m	Convulsiones, retraso psicomadurativo, hipertonía
	10	10/2014	F	10 m	Hipotonía, pérdida de habilidades motoras adquiridas
	11	06/2015	F	26 d	Convulsiones, cianosis, apneas, reflujo gástrico
	12	05/2016	M	1 a 3 m	Hemiparesia, hipotonía, hemorragia central arterial
	13	05/2016	M	2 a	Encefalopatía severa, retraso psicomotor
	14	07/2016	M	2 a 9 m	Encefalopatía progresiva
	15	07/2016	F	9 m	Hipotonía axial
	16	08/2016	F	1 a	Fallo de medro
	17	09/2016	F	9 m	Hipotonía axial
	18	11/2016	M	1 a 3 m	Microcefalia, síndrome convulsivo
	19	11/2016	M	1 a 5 m	Hipotonía, dismorfia, dificultad para deglutir
	20	12/2016	M	9 m	Retraso psicomotor
<b>JUVENIL</b>	1	04/2012	M	14 a	Atrofia muscular, movimientos coreoatetóticos
	2	06/2012	M	8 a	Ataxia, hipotonía perinatal
	3	08/2012	M	16 a	Ataxia, distonía
	4	09/2012	M	18 a	Neurodegeneración progresiva
	5	09/2012	F	4 a	Distonía, Síndrome de Tourette
	6	06/2014	M	7 a	S/D
	7	07/2014	M	18 a	Neuromiopatía
	8	07/2015	M	5 a 7 m	Ataxia, Trastorno del habla, retraso global desarrollo
	9	07/2016	F	18 a	Síndrome parkinsoniano
<b>ADULTO</b>	1	04/2014	F	29 a	Trastorno de la marcha, miopatía, atrofia muscular
	2	09/2014	F	39 a	Disfagia, trastorno de la marcha, Síndrome depresivo
	3	10/2014	M	27 a	Enfermedad de la motoneurona
	4	02/2015	M	51 a	Enfermedad de la motoneurona
	5	11/2016	M	38 a	Ataxia, Regresión psicomadurativa
<b>TOTAL</b>	<b>34</b>				

\* S/D= Sin datos

En todos los pacientes diagnosticados con ES, y siempre que fue posible, también se incluyó el análisis de los padres y en algunos casos a otros familiares.

### 2.3.2 Estrategia diagnóstica

Para el diagnóstico de la ES se siguió un algoritmo de trabajo que incluyó en primer instancia el análisis bioquímico y en segunda, el estudio a nivel molecular (Fig. 16).

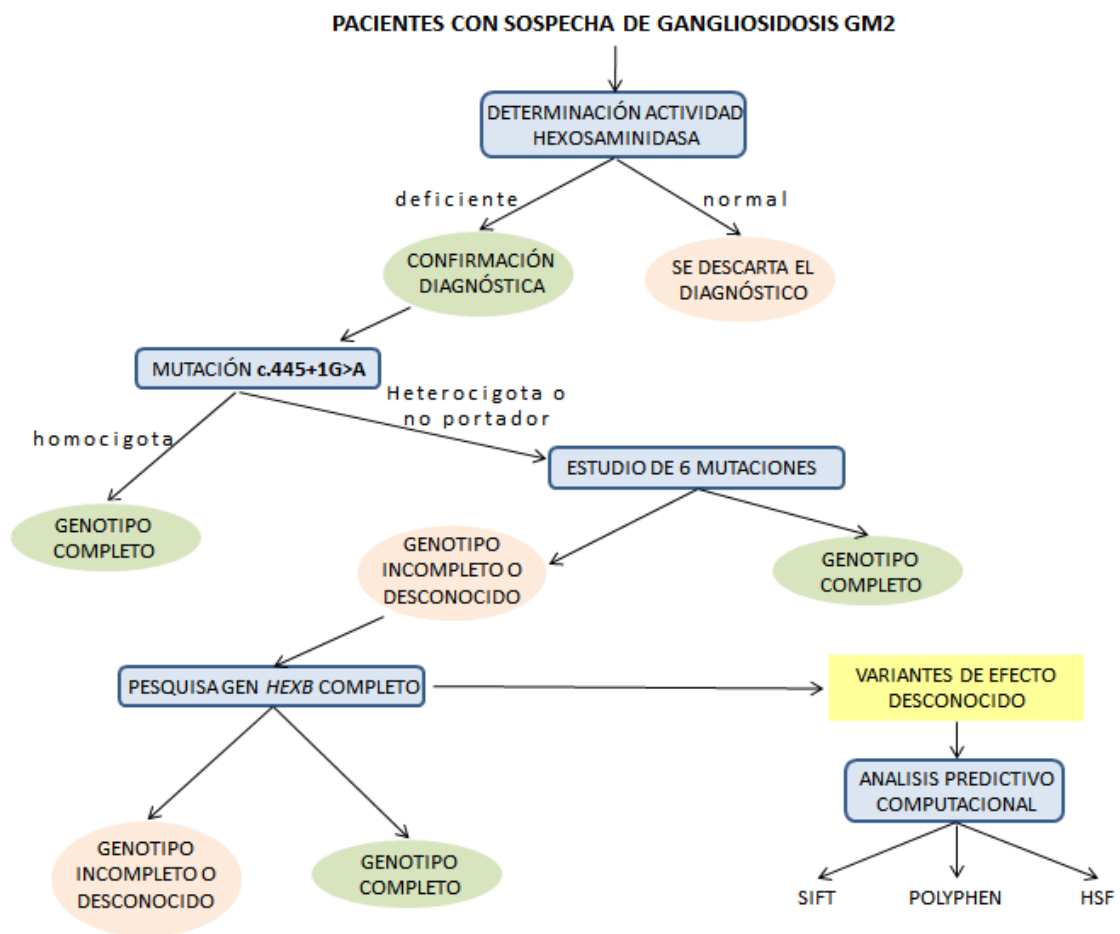
El estudio bioquímico consistió en la determinación de la actividad Hex en plasma en los pacientes con sospecha clínica de Gangliosidosis GM2. Aquellos con valores de actividad residuales o nulos fueron confirmados como enfermos, mientras que los valores normales, descartaron la patología (Ver apartado 2.3.2.1).

En los pacientes confirmados con ES, se procedió con la investigación a nivel molecular, que comprendió 3 etapas diferentes. En primer lugar, se analizó la mutación más frecuente, c.445+1G>A, utilizando técnicas de restricción enzimática. Los resultados posibles fueron: Paciente homocigota mutado (A/A), heterocigota o portador (G/A) y no portador (G/G). El genotipo se consideró completo únicamente en los pacientes que resultaron homocigotas (Ver apartado 2.3.2.3).

Cuando los pacientes resultaron heterocigotas o no portadores de la mutación c.445+1G>A, se procedió con la segunda etapa (Ver apartados 2.3.2.5, 2.3.2.6 y 2.3.2.7). Ésta consistió en la amplificación por PCR y secuenciación de los exones 7, 8, 10, 12 y 13 del gen *HEXB*, donde se encuentran las 6 mutaciones: c.782\_785delCTTT (p.Ser261Cysfs\*13), c.1082+5G>A, c.1242+1G>A, c.1451G>A (p.Gly484Glu), c.1597C>T (p.Arg533Cys) y c.1601G>A (p.Cys534Tyr). Estas mutaciones fueron identificadas previamente en pacientes argentinos diagnosticados en CEMECO entre los años 1970-2010 (Zampieri et al., 2012).

Por último, en aquellos pacientes que luego de la segunda etapa continuaron con genotipo incompleto o desconocido, se investigaron los restantes exones del gen *HEXB* por amplificación por PCR y secuenciación.

En aquellos casos que se identificaron variantes con efecto desconocido, se realizó un análisis bioinformático con el objetivo de predecir su posible impacto. Siempre que fue posible, las mutaciones identificadas en los pacientes se corroboraron en los padres y en algunos casos, se investigaron a otros familiares con el fin de detectar portadores.



**Figura 16. Algoritmo de trabajo para el diagnóstico de la enfermedad de Sandhoff.**

### 2.3.2.1 Determinación de la actividad Hexosaminidasa

Se midieron tanto la actividad de Hex parcial (Hex B) como de Hex total (Hex A + Hex B) en plasma sanguíneo según el método fluorogénico con inactivación térmica (O'Brien et al., 1970).

Para obtener el plasma se partió de 3ml de sangre entera heparinizada y se separó por centrifugación a 2000 xg. Se conservó a -20°C hasta su utilización.

Para realizar la determinación enzimática, el plasma se descongeló y se diluyó en proporción 1/10 con búfer fosfato-citrato (pH 4,4). Se colocó 50µl de plasma diluido en 4 tubos Eppendorf de 1,5ml. Para medir la Hex parcial (Hex B) se tomó dos de los tubos y se incubaron a 60°C durante 2'30'', la Hex A es lábil a la temperatura y se desnaturaliza. Luego se agregó en todos los tubos 100µl de solución 1mM de sustrato artificial (4-metilumbeliferil-N-acetil-β-D-glucosaminide) y se incubó a 37°C durante 1 hr. Finalizada la incubación se agregó 1,35ml de búfer de parada (0,2 M Carbonato - Glicina, pH 10,5).

Se preparó una curva de calibración con 4-metilumbeliferona en el rango de 0,5-10 nmol. Los valores de actividad enzimática se detectaron en un espectrofluorómetro LS 50 B Perkin Elmer con longitudes onda de excitación de 365 nm y de emisión de 450 nm. Los resultados se expresaron en nmol/ml de plasma/hr.

Los ensayos se realizaron por duplicado y se incluyó un blanco de reacción por cada muestra. Los valores tomados como referencia para la actividad de las Hex fueron tomados de Oller Ramírez, AM, tesis doctoral, 1996 (Tabla 10).

**Tabla 10. Valores de referencia para la actividad Hexosaminidasa**

VALOR	HEXOSAMINIDASA*	
	PARCIAL (B)	TOTAL (A+B)
NORMAL	140-600	400-1150
PORTADOR	50-200	200-590
ZONA GRIS	140-200	400-590

\* Valores expresados en nmol/ml de plasma/hr

### 2.3.2.2 Extracción de ADN

Idem apartado 2.2.2.1 (pág. 61).

### 2.3.2.3 Estudio de la mutación más frecuente c.445+1G>A

Se amplificó por PCR siguiendo el protocolo detallado en apartado 3.2.2.3. Los cebadores utilizados para la reacción se detallan en Tabla 11. El cebador HEXB-RFLP-2R presenta un sitio de apareamiento erróneo (en inglés, *mismatch*), diseñado especialmente para generar un sitio de restricción para la enzima MAEIII (Brown et al., 1992).

**Tabla 11. Cebadores utilizados para análisis de la mutación c.445+1G>A**

<b>CEBADOR</b>	<b>REGION</b>	<b>SECUENCIA (5' – 3')</b>	<b>TAMAÑO PRODUCTO</b>
HEXB-RFLP-2F HEXB-RFLP-2R	EXÓN 2	AGGAGTAACTACAATGTTACTAG ATAATACACTCACATTGCATAGGTA <b>G</b> TTA	263 pb

\* El nucleótido resaltado en color rojo corresponde a un *mismatch*.

A continuación, se preparó una mezcla de reacción para la enzima MAE II de acuerdo al protocolo del fabricante (Roche). Se agregó cantidad necesaria de producto de PCR y se incubó a 55°C durante 1 hr. Los productos obtenidos se separaron por electroforesis a 35mA durante 1 hr en gel de acrilamida al 8%. El gel se tiñó con una solución de Bromuro de Etidio 0,5mg/ml y los productos se visualizaron utilizando un transiluminador UV (UVP).

### 2.3.2.4 Diseño de cebadores

Para el diseño de cebadores se utilizó el software PRIMER 3 (Untergasser et al., 2012). Las secuencias de nucleótidos obtenidas permitieron posteriormente la amplificación de cada uno de los 14 exones junto a secuencias intrónicas adyacentes y las regiones no traducidas UTR 5' y 3' del gen *HEXB* (Tabla 12).

### 2.3.2.5 Amplificación génica

Se amplificaron todos los exones y regiones flanqueantes del gen *HEXB* siguiendo el protocolo de PCR detallado en apartado 3.2.2.3. Los cebadores utilizados se encuentran listados en la Tabla 12.

**Tabla 12. Secuencia de los cebadores utilizados en la amplificación del gen *HEXB***

<b>CEBADOR</b>	<b>REGION</b>	<b>SECUENCIA (5' – 3')</b>	<b>TAMAÑO PRODUCTO</b>
HEXB_U5'-1F HEXB_U5'-1R	UTR 5' - EXÓN 1	TCTTACTTTAGCCATCCCCTGT TTCCACTTACTATCCGGCTCTC	810
HEXB_2F HEXB_2R	EXÓN 2	GGACTTACAATGGGCAGCAT TGGTTCCTAGCATGGAGTCAG	350
HEXB_3F HEXB_3R	EXÓN 3	AGTTAGAGAAATAGGTCATGTGCTTG TGGAACTACATAACAAAGCATTCTG	327
HEXB_4-5F HEXB_4-5R	EXONES 4 y 5	AGATGAGTAGAGAAGTGCAATGGAT CAAATCCCCTGTTCCAAACTA	741
HEXB_6F HEXB_6R	EXÓN 6	GAAGCAATTCCAAATGTAGATAGGTA TTATGGATGTAAAATGCTAAGTCACA	347
HEXB_7F HEXB_7R	EXÓN 7	TTTCTACTCCTGAACTATGGCACT CAGTGAGCCGAGATTGTACTACTG	421
HEXB_8F HEXB_8R	EXÓN 8	TCAGGAAACCCTTCTTATCTGG TTTTAAAGGGGTTTTAAGGAATCAT	382
HEXB_9F HEXB_9R	EXÓN 9	GCAAATAGCTTTAGATGGAGGAGA TTTAGAACAGATGACTGCCTTCC	564
HEXB_10-11F HEXB_10-11R	EXONES 10 y 11	CACCTCTCAAATGCAAGAAATC GGAGGTTAGGGAAGAAAACACTATAA	887
HEXB_12-13F HEXB_12-13R	EXONES 12 y 13	AGGATAAAGATGGAGGAAACAAATC CAGCATTACTGAAAATAAGGGAAGA	666
HEXB_14-U3'F HEXB_14-U3'R	EXÓN 14 - UTR 3'	TCCCTTATTTTCAGTAATGCTGTG CAAAGTTGTGTTTCTTTGTGTCC	395

#### 2.3.2.6 Purificación y secuenciación de los productos amplificados

Idem apartado 2.2.2.4 (Ver pág. 63).

## 2.4 Investigación de mutaciones causantes de enfermedad de Sandhoff en la población de Traslasierra de Córdoba

Se realizó un estudio molecular para investigar la frecuencia de todas las mutaciones identificadas hasta la fecha en pacientes argentinos: c.445+1G>A, c.782\_785delCTTT (p.Ser261Cysfs\*13), c.1082+5G>A, c.1242+1G>A, c.1451G>A (p.Gly484Glu), c.1597C>T (p.Arg533Cys) y c.1601G>A (p.Cys534Tyr) en la población de Traslasierra de Córdoba. Las mutaciones previamente mencionadas fueron identificadas en pacientes con ES diagnosticados en CEMECO entre los años 1970 y 2010 (Brown et al., 1992;



Kleiman y col., 1994; Oller de Ramírez, 1996; Dodelson de Kremer y Oller de Ramírez, 2003 Zampieri et al., 2012).

#### 2.4.1 *Material biológico*

Se trabajó con 200 muestras de sangre recolectadas en un muestreo poblacional realizado por la Dra. Ana María Oller de Ramírez y su becaria, la Dra. Adriana Becerra, en el año 2007. Este muestreo fue realizado entre julio y diciembre, primero se realizaron las firmas de los consentimientos informados, registro de datos y por último las extracciones de material biológico.

Los individuos que participaron del estudio poblacional cumplieron con los siguientes criterios de inclusión: A) De cualquier sexo o edad B) Provenientes de la región de riesgo. C) Sin antecedentes familiares de ES.

Asimismo, la participación en el proyecto fue voluntaria y siguió las normas bioéticas aprobado por el Comité Interinstitucional de Ética de la Investigación en Salud (CIEIS), inscripto en el Registro Provincial de Investigación en Salud (REPIS, Ministerio de Salud, Provincia de Córdoba). Todos los participantes firmaron previamente el consentimiento informado.

Las muestras fueron tomadas en individuos oriundos de diferentes localidades de la zona de Traslasierras (Tabla 13).

**Tabla 13. Proveniencia de los individuos que participaron del estudio poblacional**

<b>N° INDIVIDUOS</b>	<b>LOCALIDAD</b>
18	San Pedro
23	Mina Clavero
22	Villa Dolores
78	San Lorenzo
9	Nono
48	Villa Las Rosas
2	Cruz del eje
200	

#### 2.4.2 Investigación de mutaciones

Para la pesquisa de las mutaciones se utilizaron 2 técnicas diferentes de biología molecular. Por un lado, las mutaciones c.445+1G>A y c.782\_785delCTTT (p.Ser261Cysfs\*13) fueron investigadas mediante ensayos de restricción. Por otra parte, para el análisis de las mutaciones c.1082+5G>A, c.1242+1G>A, c.1451G>A (p.Gly484Glu), c.1597C>T (p.Arg533Cys) y c.1601G>A (p.Cys534Tyr) se realizó un estudio colaborativo con la Dra. Andrea Dardis, del Centro Coordinador Regional de Enfermedades Raras, Hospital Universitario “Santa Maria della Misericordia”, Udine, Italia. El trabajo consistió en la amplificación por PCR y secuenciación de los exones 8, 10, 12, 13 del gen *HEXB*. En total se realizaron 400 determinaciones por digestión enzimática y se analizaron 800 electroferogramas.

#### 2.4.3 Ensayos de restricción enzimática

La mutación c.445+1G>A fue analizada según el protocolo descrito en apartado 2.3.2.3.

Para el análisis de la mutación c.782\_785delCTTT (p.Ser261Cysfs\*13), se amplificó por PCR de acuerdo al protocolo detallado en 2.3.2.3, utilizando una temperatura de hibridación de 56°C y los cebadores específicos detallados en tabla 14.

**Tabla 14. Cebadores para el análisis de la mutación c.782\_785delCTTT (p.Ser261Cysfs\*13)**

<b>CEBADOR</b>	<b>REGION</b>	<b>SECUENCIA (5' – 3')</b>	<b>TAMAÑO PRODUCTO</b>
HEXB-RFLP-7F HEXB-RFLP-7R	EXÓN 7	ACAATTTCCAGGATCAAATCT GGTGACAGAACAAGACTCCA	261 pb

Para la digestión se utilizó la enzima *XmnI* de acuerdo al protocolo del fabricante (*New England Biolabs*). Se incubó a 37°C durante 3 hr y los productos obtenidos se separaron por electroforesis a 35mA durante 1 hr en gel de acrilamida al 8%. El gel se tiñó con una solución de Bromuro de Etidio

0,5mg/ml y los productos se visualizaron utilizando un transiluminador UV (UVP).

#### 2.4.4 Amplificación y secuenciación de exones específicos del gen *HEXB*

Se utilizó el protocolo de amplificación por PCR y secuenciación estándar descritos en los apartados 2.3.2.5 y 2.3.2.6, utilizando los cebadores para los exones 8, 10, 12 y 13 del gen *HEXB*, detallados en la tabla 12.

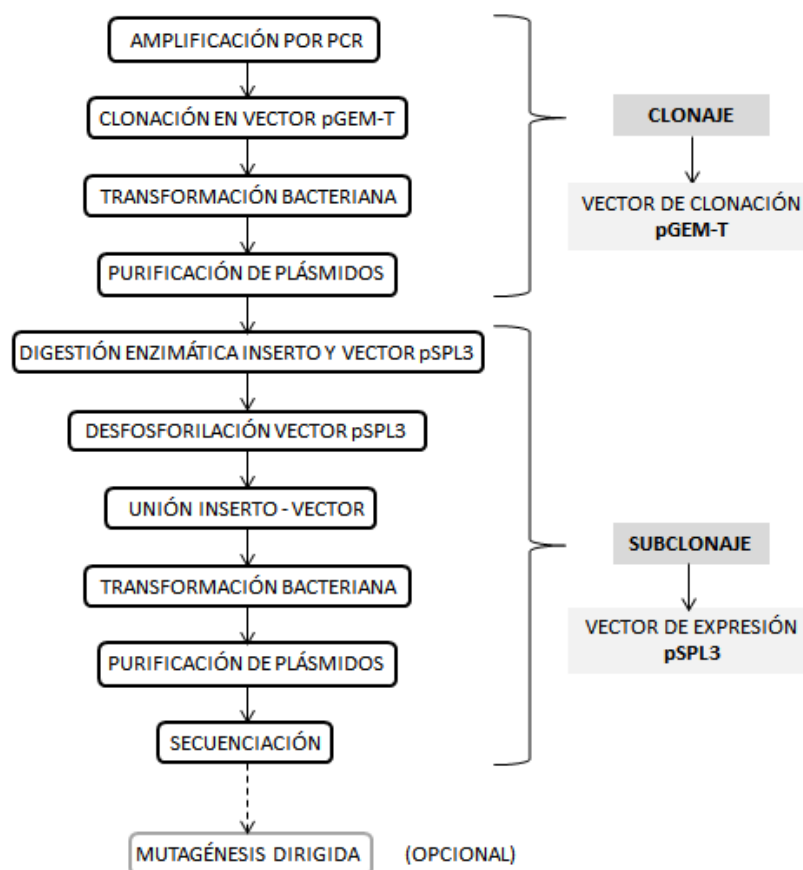


Figura 17. Protocolo general para obtención de minigenes.

## 2.5 Análisis fenotípico de mutaciones intrónicas en el gen *HEXB* mediante expresión de minigenes en células eucariotas en cultivo

Para determinar las consecuencias fenotípicas de las mutaciones c.445+1G>A y c.1509-26G>A se construyeron modelos *in vitro* llamados “minigenes”. Estos contienen parte del vector de expresión pSPL3 y parte de

las secuencias de interés, en este caso, los exones 2 y 13 del gen *HEXB*. Una vez obtenidos los modelos, es posible la inserción de las mutaciones mediante la técnica de mutagénesis dirigida (Fig. 17).

### 2.5.1 Obtención de minigenes

Para generar los minigenes EX2 y EX13 se siguió un protocolo que comprendió diferentes etapas de clonaje y subclonaje, basado en el trabajo de Desviat et al., 2012 (Fig. 13). Una vez obtenidos los minigenes con la secuencia normal o *wild-type*, se procedió a generar los minigenes mutados utilizando la técnica de mutagénesis dirigida.

#### 2.5.1.1 Amplificación por PCR

Se amplificaron por PCR los exones 2 y 13 del gen *HEXB*, siguiendo el protocolo descrito en el apartado 2.3.2.5. Los cebadores utilizados se detallan en la tabla 15.

**Tabla 15. Cebadores utilizados para obtener los minigenes EX2 y EX13**

<b>CEBADOR</b>	<b>REGION</b>	<b>SECUENCIA (5' – 3')</b>	<b>TAMAÑO PRODUCTO</b>
MINIGEN-EX2F MINIGEN-EX2R	EXÓN 2	ATCCTATCACTGGTCAGAATTGGT TCTGCTGGGATTATGAGTGATTA	735
MINIGEN-EX13F MINIGEN-EX13R	EXÓN 13	GAAACAGAAACAACCTTTTCATTGG TCTGTCATAGGCTGCATCCA	284

#### 2.5.1.2 Clonación en vector pGEM-T

Los productos de PCR se insertaron en el vector de clonación pGEM<sup>®</sup>-T, siguiendo las instrucciones del fabricante (Promega).

#### 2.5.1.3 Transformación de cepas de *Escherichia coli*

Se transformaron células competentes *E. coli* XL1-Blue mediante técnica de choque térmico. Se preparó una mezcla de 2 µl de plásmido y 50 µl bacterias y se incubaron a 42°C durante 45". Las células transformadas se sembraron en placas con agar-medio Luria Broth (LB), ampicilina 1mg/ml, 60 µl

de X-Gal (2%) y 10  $\mu$ l de IPTG (1M). Se cultivaron a 37°C con agitación durante toda la noche. Al día siguiente, se picaron las colonias resultantes y se cultivaron en medio LB a 37°C con agitación durante toda la noche.

#### 2.5.1.4 Purificación de plásmidos

Para purificar los plásmidos se siguió el protocolo del kit de Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega).

#### 2.5.1.5 Digestión enzimática

Tanto los plásmidos purificados como el vector de expresión pSPL3 fueron digeridos con la enzima EcoRI (New England Biolabs) siguiendo las instrucciones del fabricante.

#### 2.5.1.6 Desfosforilación vector pSPL3

Con el objetivo de evitar la recircularización del vector pSPL3, se procedió a la desfosforilación de sus extremos utilizando el protocolo provisto para la enzima *TSAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase* (Promega).

#### 2.5.1.7 Unión inserto-vector

Para ligar el inserto con el vector pSPL3 se siguieron las instrucciones del Kit Rapid DNA Ligation (Roche).

#### 2.5.1.8 Secuenciación

Para confirmar la presencia y orientación de los insertos, se secuenció parte del vector pSPL3 utilizando los cebadores detallados en tabla 16.

**Tabla 16. Cebadores utilizados para secuenciación del vector pSPL3**

<b>CEBADOR</b>	<b>REGION</b>	<b>SECUENCIA (5' – 3')</b>
SD6	Vector pSPL3	TCTGAGTCACCTGGACAACC
SA2		ATCTCAGTGGTATTTGTGAGC

La electroforesis capilar se realizó en un secuenciador ABI 3100XL. Los electroferogramas fueron analizados utilizando el software Chromas 2.6.2 (Technelysium Pty., Australia).

#### 2.5.1.9 Mutagénesis dirigida

Con el objetivo de introducir las mutaciones intrónicas c.445+1G>A y c.1509-26G>A en los minigenes EX2 y EX13, respectivamente, se diseñaron cebadores degenerados utilizando la herramienta online <http://www.genomics.agilent.com/primerDesignProgram.jsp> (Tabla 17).

**Tabla 17. Cebadores utilizados para mutagénesis dirigida en minigenes**

<b>CEBADOR</b>	<b>SECUENCIA (5' – 3')</b>
EX2-MUT-A	CACTCACATTGCATAGGTACTTATAAGACTCATCTGAAGATATG
EX2-MUT-B	CATATCTTCAGATGAGTCTTATAAGTACCTATGCAATGTGAGTG
EX13-MUT-A	CTAAAATTTAAATCACACATCCCCCTGCAAGCAGTTTAAATTTATG
EX13-MUT-B	CATAAATTTAAACTGCTTGCAGGGGGATGTGTGATTTAAATTTAG

Para la reacción de amplificación se siguieron las instrucciones del kit QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis (Agilent Technologies).

#### 2.5.2 Análisis funcional *in vitro* de las mutaciones intrónicas c.445+1G>A y c.1509-26G>A

Para analizar a nivel *in vitro* el efecto de las mutaciones c.445+1G>A y c.1509-26G>A, se procedió con la transfección de los minigenes EX2 y EX13 en sus versiones *wild-type* y mutados, en cultivos celulares y posteriormente, se analizaron los perfiles obtenidos mediante la extracción de ARN, RT-PCR, purificación y secuenciamiento.

##### 2.5.2.1 Transfección en cultivos celulares

Se trabajó con las líneas celulares comerciales COS-7 y HEK293. Se sembraron 400.000 células por pocillo en una placa P6. A las 24 hs se transfectaron de 1-3 µg de los minigenes utilizando el reactivo JetPEI®, de acuerdo a las indicaciones del fabricante (Polyplus-transfection). Los cultivos se

mantuvieron con medio MEM suplementado con suero fetal bovino a 37°C en una atmósfera con 5% CO<sub>2</sub> durante 24 o 48 hs.

#### 2.5.2.2 *Extracción de ARN*

Se aspiró el medio de cultivo de las placas p6 y se lavaron las células con tampón fosfato salino (PBS). Se agregó el reactivo TRIzol (Invitrogen) y se continuó con el protocolo de acuerdo a las indicaciones del fabricante. El precipitado de ARN obtenido fue resuspendido en 20 µl de agua libre de nucleasas (Promega), las muestras fueron almacenadas a -80°C hasta su uso.

#### 2.5.2.3 *RT-PCR*

La síntesis de ADNc total se llevó a cabo siguiendo el protocolo de la retrotranscriptasa M-MLV RT (Promega). Se partió de 2 µg de ARN total y se utilizó 0,5 µg de cebadores al azar (Amersham) por cada µg de ARN.

Para la amplificación por PCR se siguió el protocolo detallado en el apartado 2.5.1.1. Se utilizó una temperatura de hibridación de 60°C y los cebadores listados en la tabla 16.

#### 2.5.2.4 *Purificación y secuenciación*

Los productos obtenidos fueron purificados a partir de gel de agarosa utilizando el kit QIAquick Gel Extraction (QIAGEN). La electroforesis capilar se llevó a cabo en un secuenciador ABI 3100XL. Los electroferogramas fueron visualizados utilizando el software Chromas 2.6.2 (Technelysium Pty., Australia).

#### 2.5.3 *Obtención de variantes adaptadas de U1snRNA*

Se partió del vector pG3U1 (WT-U1) que contiene la secuencia U1snRNA normal o *wild-type* (Susani et al., 2004). Se diseñaron cebadores degenerados utilizando el programa bioinformático en línea <http://www.genomics.agilent.com/primerDesignProgram.jsp> (Tabla 18).

**Tabla 18. Cebadores utilizados para mutagénesis dirigida en vector pG3U1**

<b>CEBADOR</b>	<b>SECUENCIA (5' – 3')</b>
MUT_U1+1_A	CTCCCCTGCCAGATAAGTATGAGATCTTGGGCC
MUT_U1+1_B	GGCCCAAGATCTCATACTTATCTGGCAGGGGAG
MUT_U1+1-1_A	CTCCCCTGCCATATAAGTATGAGATCTTGGGCC
MUT_U1+1-1_B	GGCCCAAGATCTCATACTTATATGGCAGGGGAG
MUT_U1+1-1-2_A	GTATCTCCCCTGCCTTATAAGTATGAGATCTTGGGCCTC
MUT_U1+1-1-2_B	GAGGCCCAAGATCTCATACTTATAAGGCAGGGGAGATAC

Se llevó a cabo la reacción de amplificación según las instrucciones del kit QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis (Agilent Technologies).

#### 2.5.4 *Ensayo terapéutico en modelo in vitro de la mutación c.445+1G>A*

Con el objetivo de evaluar si la sobreexpresión de las variantes de U1snRNA tiene algún efecto sobre la mutación c.445+1G>A, se procedió con la transfección simultánea en líneas celulares del minigen EX2 wild-type y mutado, y de los vectores de U1snRNA adaptados obtenidos previamente.

Los experimentos se llevaron a cabo siguiendo el protocolo descrito en el apartado 2.5.2. Se co-transfectaron 2 µg de minigen y concentraciones crecientes entre 1-4 µg de variantes de U1snRNA. El experimento se realizó por triplicado y variando el tiempo de exposición entre 24 y 48 hs.



### 3 RESULTADOS

#### 3.1 Diagnóstico molecular de la fibrosis quística

El análisis molecular para FQ se llevó a cabo en 3 grupos de pacientes diferentes a los cuales se implementó una estrategia diagnóstica específica.

Grupo A: 12 pacientes con genotipo incompleto o desconocido que ingresaron a CEMECO en el periodo 2001-2008. Se les analizó el gen *CFTR* completo por PCR/secuenciación.

Grupo B: 3 pacientes derivados por el Servicio de Neumonología del Hospital de Niños en el año 2015 sin ningún tipo de estudio molecular previo. Inicialmente se realizó la secuenciación de exones específicos del gen *CFTR* con el objetivo de analizar las mutaciones más frecuentes y en una segunda etapa, en aquellos que continuaron con genotipo desconocido o incompleto, se secuenciaron todos los exones del gen.

Grupo C: 2 pacientes con diagnóstico de FQ clásico que ingresaron a CEMECO en el año 2000 y que presentaron variantes génicas con efecto desconocido. Se investigaron estas variantes utilizando programas bioinformáticos predictivos.

##### 3.1.1 *Análisis del gen CFTR en pacientes del grupo A*

Se detectaron 11 variantes diferentes y se pudo determinar el genotipo completo en 9 de los 12 pacientes (Tabla 19). La mayoría de las mutaciones identificadas resultaron ya descritas en las bases de datos internacionales *CFTR1* y *CFTR2* (Tabla 20) (Cystic Fibrosis Centre at the Hospital for Sick Children in Toronto, 2011; US CF Foundation Johns Hopkins University, 2011). La excepción fue el cambio c.3254A>T (p.His1085Leu), que aún no ha sido reportado en la bibliografía, y por tanto, se trata de una mutación nueva a nivel mundial. En este grupo no fue posible confirmar la presencia de las mutaciones en los padres.

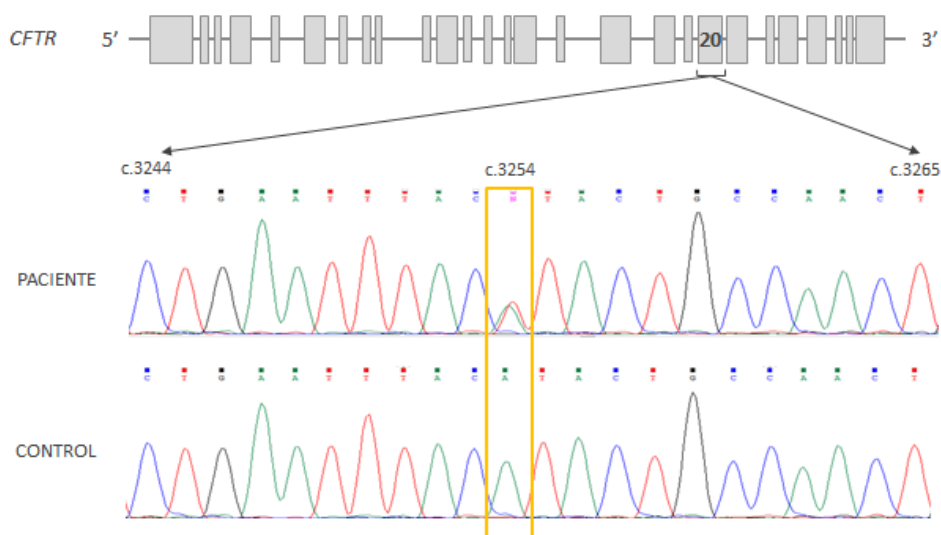
La variante c.3254A>T (p.His1085Leu) se encontró en heterocigosis en el exón 20 del gen *CFTR* en un único paciente (Fig. 18). Se trata de una

sustitución de adenina por timina en posición c.3254 que tiene como consecuencia un cambio de histidina por leucina en posición 1085 de la proteína CFTR.

**Tabla 19. Mutaciones identificadas en pacientes del grupo A**

PACIENTE	SEXO	EDAD	FENOTIPO	GENOTIPO	
FQ-A1	F	6a	Clásico	c.1521_1523delCTT (F508del)	c.1585-8G>A (1717-8G>A)
FQ-A2	F	15a	Clásico	c.1521_1523delCTT (F508del)	?
FQ-A3	M	12a	Clásico	c.3196C>T (R1066C)	c.3276C>A (Y1092X)
FQ-A4	M	2m	Clásico	c.1521_1523delCTT (F508del)	c.3196C>T (R1066C)
FQ-A5	F	20a	CFTR RD	?	?
FQ-A6	M	2m	Clásico	c.490-2A>G (622-2A>G)	c.3254A>T, p.His1085Leu
FQ-A7	F	29a	Clásico	c.1650delA (1782delA)	c.3160C>G (H1054D)
FQ-A8	M	29a	Clásico	c.1521_1523delCTT (F508del)	c.3140-26A>G (3272-26G>A)
FQ-A9	M	28a	ABCD	c.3454G>C (D1152H)	c.4242_4242+1delinsTT (4374_4374+1GG>TT)
FQ-A10	M	50a	ABCD	c.1657C>T (R553X)	c.613C>T (P205S)
FQ-A11	M	8a	Clásico	?	?
FQ-A12	F	1a	Clásico	c.2657+5G>A (2789+5G>A)	c.2816A>G (H939R)

+ Las mutaciones en color rojo son aquellas identificadas en este trabajo. ++ En rojo y negrita se destaca la mutación nueva. +++ La nomenclatura utilizada para las mutaciones es la actual y entre paréntesis se encuentra la tradicional.



**Figura 18. Mutación c.3254A>T (H1085L).** Electroferograma correspondiente a una región del exón 20. En la secuencia del paciente se observa el doble pico en posición c.3254, cambio A>T en heterocigosis.

Tabla 20. Características de las mutaciones detectadas en pacientes grupo A

NOMENCLATURA MUTACIÓN			UBICACIÓN	BASES DE DATOS*			
NUEVA		TRADICIONAL		CFTR1		CFTR2	
POSICIÓN cADN	PROTEINA			Nº PACIENTES**	FUENTES BIBLIOGRÁFICAS	CONSECUENCIA	FREC.
c.490-2A>G	-	622-2A>G	Intrón 5	1	Oller AM et al., 2008	s/d	s/d
c.613C>T	p.Pro205Ser	P205S	Exón 6	3	Chillón M et al., 1993	Causa FQ	0.00017
c.1585-8G>A	-	1717-8G>A	Intrón 11	1	-	Causa FQ	0.00897
c.1650delA	p.Gly551Valfs*8	1782delA	Exón 12	1	-	Causa FQ	0.00007
c.2816A>G	p.His939Arg	H939R	Exón 17	1	Polizzi A et al., 2011	s/d	s/d
c.3140-26A>G	-	3272-26G>A	Intrón 19	1	Amaral et al., 2001	Variable	0.00266
c.3160C>G	p.His1054Asp	H1054D	Exón 20	1	Ferec C et al., 1993	Causa FQ	0.00011
c.3196C>T	p.Arg1066Cys	R1066C	Exón 20	1	Casals T et al., 1996; Casals T et al., 1997	Causa FQ	0.00172
<b>c.3254A&gt;T</b>	<b>p.His1085Leu</b>	<b>H1085L</b>	Exón 20	-	<i>Este trabajo de tesis</i>	s/d	s/d
c.3276C>A	p.Tyr1092*	Y1092X	Exón 20	1	-	Causa FQ	0.00202
c.4242_4242+1delinsTT	4374_4374+1GG>TT	-	Exón 26 / Intrón 26	1	-	s/d	s/d

\*Información tomada de las base de datos CFTR1 y CFTR2 (Cystic Fibrosis Centre at the Hospital for Sick Children in Toronto, 2011; US CF Foundation Johns Hopkins University, 2011)

\*\* Número de pacientes inicialmente reportados

s/d: Sin datos

### 3.1.2 Análisis de mutaciones frecuentes en pacientes del grupo B

Se estudiaron en primera instancia las mutaciones más frecuentes y en los pacientes FQ-B1 y FQ-B2 fue posible identificar el genotipo completo. El paciente FQ-B3 resultó inicialmente portador de la mutación F508del y luego del análisis completo del gen *CFTR* se identificó el alelo complejo [c.1727G>C (G576A); c.2002C>T (R668C)]. En todos los casos, las mutaciones resultaron conocidas y su presencia fue corroborada tanto por vía materna y paterna (Tabla 21).

**Tabla 21. Mutaciones identificadas en pacientes del grupo B**

PAC.	SEXO	EDAD	FENOTIPO	GENOTIPO	
				ALELO MATERNO	ALELO PATERNO
FQ-B1	F	13a	CLASICO	c.1521_1523delCTT (F508del)	c.3196C>T (R1066C)
FQ-B2	M	4m	CLASICO	c.1521_1523delCTT (F508del)	c.1521_1523delCTT (F508del)
FQ-B3	M	7a	CFTR RD	[c.1727G>C (G576A); c.2002C>T (R668C)]	c.1521_1523delCTT (F508del)

### 3.1.3 Predicción del efecto de mutaciones mediante análisis informático

Se investigó mediante programas bioinformáticos predictivos las posibles consecuencias de 3 variantes con efecto desconocido: c.3254A>T (H1085L), c.79G>A (G27R) y c.829T>A (W277R). La variante H1085L fue identificada en un paciente del grupo A (genotipo: c.490-2A>G / H1085L), mientras que las dos restantes fueron identificadas en los dos pacientes que integran el grupo C (genotipos: F508del / W277R y F508del / G27R).

Utilizando los programas *SIFT* y *POLYPHEN* se analizaron posibles consecuencias estructurales y funcionales en la proteína resultante. Mediante el uso de la herramienta *HSF* se investigó si estas variantes afectan directa o indirectamente al proceso de corte y empalme.

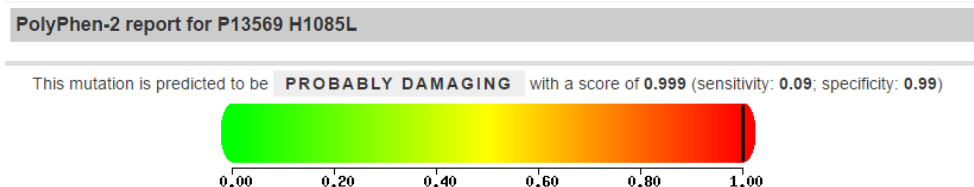
### 3.1.3.1 Investigación de la variante H1085L

Predicción del programa SIFT: El cambio de aminoácido de leucina por histidina en la posición 1085 no sería tolerado por la proteína CFTR (Fig. 19).

Predict Not Tolerated	Position Seq Rep	Predict Tolerated
mwi v f c l y r p q a h t k e	1083N 1.00	s g DN
	w 1084L 1.00	c m f h y p i g v r Nt q s d L k A E
mwi c v f l y p r q a t e k s	<u>1085H</u> 1.00	g d NH
w f y h m c i l r g e	1086T 1.00	v p d k n a Q S T
w y f c m	1087A 1.00	h i v l p g n r t q d S E K A

**Figura 19. Predicción SIFT para la variante c.3254A>T (H1085L).** Hacia la izquierda de la posición 1085 se indican los cambios de aminoácidos que no serían tolerados y hacia la derecha aquellos que sí. Código de color para los aminoácidos: no polar (negro), polar sin carga (verde), básico (rojo), ácido (azul). Las letras mayúsculas indican aminoácidos que aparecen en el alineamiento, las minúsculas resultan de la predicción.

Predicción del programa POLYPHEN: La sustitución de leucina por histidina en la posición 1085 sería una variante probablemente perjudicial para la proteína CFTR La puntuación para la predicción es de 0.999 sobre 1. (Fig. 20).



**Figura 20. Predicción POLYPHEN para la variante c.3254A>T (H1085L).**

Predicción del programa HSF: El cambio c.3254A>T no provocaría ninguna alteración considerable sobre el proceso de corte y empalme. El programa predice una ligera variación en un sitio de unión a SRp40 y SRp55 pero esta no generaría ningún efecto sobre el proceso global (Fig. 21).

No significant splicing motif alteration detected. This mutation has probably no impact on splicing.				
Linked SR protein	Reference Motif (value 0-100)	Linked SR protein	Mutant Motif (value 0-100)	Variation
SRp55	TACATA (85.90)	SRp55	TACTTA (75.08)	-12.6 %
SRp40	ATACTGC (85.27)	SRp40	TTACTGC (91.56)	+7.37 %

**Figura 21. Predicción HSF para la variante c.3254A>T (H1085L).**

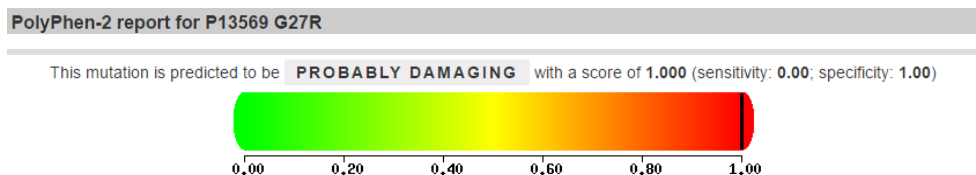
### 3.1.3.2 Investigación de la variante G27R

Predicción del programa SIFT: El cambio de aminoácido de glicina por arginina en la posición 27 no sería tolerado por la proteína CFTR (Fig. 22).

Predict Not Tolerated	Position Seq Rep	Predict Tolerated
	c Wd <b>25R</b> 1.00	f m y I v g p s h n a t l e q R K
	w c <b>26K</b> 1.00	y d f h m g p n s t v a I e Q L r K
y w v t s r q p n m l k i h f e d c a <b>27G</b> 1.00		G
c w p d m e q k n g r t i s v a <b>28Y</b> 1.00		l F H Y
c w f d m i y v g p s h n l a t e q <b>29R</b> 1.00		K R

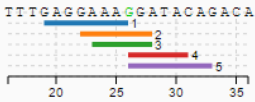
**Figura 22. Predicción SIFT para la variante c.79A>G (G27R).** Hacia la izquierda de la posición 27 se indican los cambios de aminoácidos que no serían tolerados y hacia la derecha aquellos que sí. Código de color para los aminoácidos: no polar (negro), polar sin carga (verde), básico (rojo), ácido (azul). Las letras mayúsculas indican aminoácidos que aparecen en el alineamiento, las minúsculas resultan de la predicción.

Predicción del programa POLYPHEN: La variante glicina por arginina en la posición 27 sería probablemente perjudicial para la proteína CFTR. La puntuación para la predicción es de 1 sobre 1. (Fig. 23).



**Figura 23. Predicción POLYPHEN para la variante c.79A>G (G27R).**

Predicción del programa HSF: El cambio c.79A>G afectaría un sitio exónico potenciador del proceso de corte y empalme o también llamado ESE (*Exonic Splicing Enhancer*). El programa predice además que se perderían dos sitios de unión a las proteínas SF2/ASF y SC35 (Fig. 24).

Prediction algorithm	cDNA Position	Interpretation
1 - PESE Octamers from Zhang & Chasin		Alteration of an exonic ESE site. Potential alteration of splicing.
2 - ESE-Finder - SF2/ASF		
3 - ESR Sequences from Goren et al.		
4 - HSF Matrices - 9G8		
5 - ESE-Finder - SC35		

Linked SR protein	Reference Motif (value 0-100)	Linked SR protein	Mutant Motif (value 0-100)	Variation
SF2/ASF	GAAAGGA (73.79)			Site broken -100
SC35	GGATACAG (83.22)			Site broken -100

Figura 24. Análisis HSF para la variante c.79A>G (G27R).

### 3.1.3.3 Investigación de la variante W277R

Predicción del programa SIFT: La sustitución del aminoácido triptófano por arginina en la posición 277 no sería tolerado por la proteína CFTR (Fig. 25).

Predict Not Tolerated	Position Seq Rep	Predict Tolerated
w v t s r q p n m l k i h g f e d c a	275Y 1.00	Y
w h y f m q n r d e i k l t p v	276C 1.00	s g C A
y v t s r q p n m l k i h g f e d c a	<u>277W</u> 1.00	W
y w v t s r q p n m l k i h g f d c a	278E 1.00	E
w y f c	279E 1.00	m h i v P L g N r t Q D a S K E

Figura 25. Predicción SIFT para la variante c.829T>A (W277R). Hacia la izquierda de la posición 277 se indican los cambios de aminoácidos que no serían tolerados y hacia la derecha aquellos que sí. Código de color para los aminoácidos: no polar (negro), polar sin carga (verde), básico (rojo), ácido (azul). Las letras mayúsculas indican aminoácidos que aparecen en el alineamiento, las minúsculas resultan de la predicción.

Predicción del programa POLYPHEN: EL cambio triptófano por arginina en la posición 277 sería probablemente dañino para la proteína CFTR. La puntuación para la predicción es de 1 sobre 1. (Fig. 26).

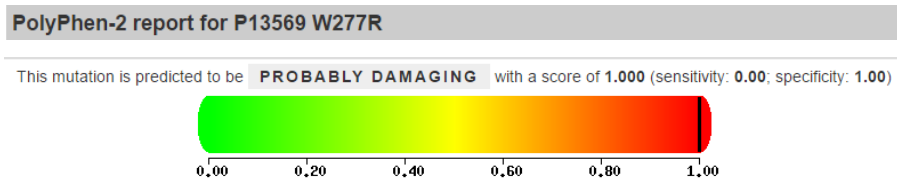


Figura 26. Predicción POLYPHEN para la variante c.829T>A (W277R).

Predicción del programa HSF: El cambio c.829T>A alteraría un sitio exónico potenciador del proceso de corte y empalme. El programa predice además que se perdería un sitio de unión a la proteína SC35 y que se generarían dos sitios nuevos para las proteínas SRp55 y SF2/ASF. Además, indica que existe una pequeña variación para la unión con SRp40, pero esta no sería perjudicial (Fig. 27).

Prediction algorithm	cDNA Position	Interpretation
1 - ESE-Finder - SC35		Alteration of an exonic ESE site. Potential alteration of splicing.
2 - ESE-Finder - SF2/ASF(Ig)		
3 - ESR Sequences from Goren et al.		
4 - EIEs from Zhang et al.		

Linked SR protein	Reference Motif (value 0-100)	Linked SR protein	Mutant Motif (value 0-100)	Variation
SC35	TACTGCTG (78.30)			Site broken -100
SRp40	CTGCTGG (78.86)	SRp40	CTGCAGG (80.36)	+1.9 %
SF2/ASF (IgM-BRCA1)	CTGCTGG (71.15)	SRp40	CTGCAGG (80.36)	+12.94 %
		SRp55	TGCAGG (75.65)	New site
		SF2/ASF (IgM-BRCA1)	TGCAGGG (71.23)	New site

**Figura 27. Predicción HSF para la variante c.829T>A (W277R).**

### 3.1.4 Actualización de la frecuencia de mutaciones en los pacientes diagnosticados con fibrosis quística en CEMECO desde 1996 hasta la fecha

Teniendo en cuenta los datos publicados previamente por nuestro grupo (Tabla 3 adaptada de Oller Ramírez et al., 2006; Oller Ramírez et al., 2008), otros datos no publicados y los resultados obtenidos en este trabajo, es posible actualizar la frecuencia alélica entre todos los pacientes diagnosticados con FQ en CEMECO (Tabla 22). Por otra parte, de todos los pacientes diagnosticados con FQ en CEMECO desde 1996 hasta la finalización del presente trabajo, 10 pacientes continuaron con genotipo incompleto o desconocido, correspondiendo al 8,75% de los alelos.



**Tabla 22. Mutaciones causantes de fibrosis quística detectadas en pacientes diagnosticados en CEMECO desde 1996 hasta la fecha (parte 1).**

<b>NOMENCLATURA NUEVA</b>		<b>NOMENCLATURA ORIGINAL</b>	<b>ALELOS (N°)</b>	<b>FRECUENCIA (%)</b>
<b>Nivel ADN</b>	<b>Nivel Proteína</b>			
c.1521_1523delCTT	p.Phe508del	F508del	128	53,33
c.3909C>G	p.Asn1303Lys	N1303K	11	4,58
c.1624G>T	p.Gly542*	G542X	9	3,75
c.3196C>T	p.Arg1066Cys	R1066C	6	2,50
c.2657+5G>A	-	2789+5G>A	5	2,08
c.1657C>T	p.Arg553*	R553X	4	1,66
c.3140-26A>G	-	3272-26A>G	4	1,66
c.1000C>T	p.Arg334Trp	R334W	3	1,25
c.1766+1G>A	-	1898+1G>A	3	1,25
c.3454G>C	p.Asp1152His	D1152H	3	1,25
c.254G>A	p.Gly85Glu	G85E	2	0,83
c.3528delC	p.Lys1177SerfsX15	3659delC	2	0,83
c.1679+1643G>T	-	1811+1.6kbA>G	2	0,83
c.1766G>T	p.Ser589Ile	S589I	2	0,83
c.1210-12T[5_9]	-	5T	2	0,83
c.3484C>T	p.Arg1162*	R1162X	2	0,83
c.490-2A>G	-	622-2A>G	2	0,83
c.3717+12191C>T	-	3849+10kbC>T	1	0,42
c.489+1G>T	-	621+1G>T	1	0,42
c.579+1G>T	-	711+1G>T	1	0,42
c.2988+1G>A	-	3120+1G>A	1	0,42
c.2738A>G	p.Tyr913Cys	Y913C	1	0,42
c.3873+1G>A	-	4005+1G>A	1	0,42
c.3266G>A	p.Trp1089*	W1089X	1	0,42
c.3848G>T	p.Arg1283Met	R1283M	1	0,42
c.3846G>A	p.Trp1282*	W1282X	1	0,42
c.3067_3072delATAGTG	p.Ile1023_Val1024del	3199del6	1	0,42
c.1364C>A	p.Ala455Glu	A455E	1	0,42
c.79G>A	p.Gly27Arg	G27R	1	0,42
c.829T>A	p.Trp277Arg	W277R	1	0,42
c.170G>A	p.Trp57*	W57X	1	0,42
c.349C>T	p.Arg117Cys	R117C	1	0,42
c.350G>A	p.Arg117His	R117H	1	0,42
c.2052delA	p.Lys684AsnfsX38	2184delA	1	0,42
[c.1399C>T; c.3766_3767insC]	[p.Leu467Phe; p.Leu1258PhefsX7]	[L467F; 3905insT]	1	0,42
c.1841A>G	p.Asp614Gly	D614G	1	0,42
c.1055G>A	p.Arg352Gln	R352Q	1	0,42
c.1209G>A	p.Glu403Glu	E403E	1	0,42

**Tabla 22. Mutaciones causantes de fibrosis quística detectadas en pacientes diagnosticados en CEMECO desde 1996 hasta la fecha (parte 2).**

<b>NOMENCLATURA NUEVA</b>		<b>NOMENCLATURA ORIGINAL</b>	<b>ALELOS (N°)</b>	<b>FRECUENCIA (%)</b>
<b>Nivel ADN</b>	<b>Nivel Proteína</b>			
[c.1727G>C; c.2002C>T]	[p.Gly576Ala; Arg668Cys]	[G576A; R668C]	<b>1</b>	<b>0,42</b>
c.1585-8G>A	-	1717-8G>A	<b>1</b>	<b>0,42</b>
c.3276C>A	p.Tyr1092*	Y1092X	<b>1</b>	<b>0,42</b>
c.3254A>T	p.His1085Leu	H1085L	<b>1</b>	<b>0,42</b>
c.3160C>G	p.His1054Asp	H1054D	<b>1</b>	<b>0,42</b>
c.1650delA	-	1782delA	<b>1</b>	<b>0,42</b>
c.613C>T	p.Pro205Ser	P205S	<b>1</b>	<b>0,42</b>
c.2816A>G	p.His939Arg	H939R	<b>1</b>	<b>0,42</b>
c.4242_4242+1delinsTT	-	4374_4374+1GG>TT	<b>1</b>	<b>0,42</b>
ALELOS DESCONOCIDOS			<b>20 (10 pacientes)</b>	<b>8,75</b>
TOTAL			<b>240 (120 pacientes)</b>	<b>100,00</b>

## 3.2 Diagnóstico de la enfermedad de Sandhoff

Se investigó a 8 pacientes que ingresaron a CEMECO con sospecha de Gangliosidosis GM2 durante el período de abril 2012 a diciembre 2016. También se incluyen dos pacientes con diagnóstico confirmado de ES que fueron derivados de otros centros médicos para su estudio a nivel molecular. Por otra parte, se investigó a los padres y otros familiares de los pacientes confirmados con ES.

La estrategia diagnóstica consistió, en primer lugar, en el estudio a nivel bioquímico con la determinación de la actividad Hex en plasma, tanto en los pacientes con sospecha de Gangliosidosis GM2, como en los familiares de aquellos pacientes confirmados con ES. En segunda instancia, se analizaron los pacientes a nivel molecular siguiendo un protocolo de 3 etapas: primero se evaluó la presencia o ausencia de la mutación más frecuente, c.445+1G>A, por técnicas de restricción enzimática; en segundo lugar se realizó un análisis parcial del gen *HEXB*, que consistió en la amplificación por PCR y secuenciación de los exones 7, 8, 10, 12 y 13 del gen *HEXB*, donde se encuentran las 6 mutaciones previamente identificadas en pacientes argentinos: c.782\_785delCTTT (p.Ser261Cysfs\*13), c.1082+5G>A, c.1242+1G>A, c.1451G>A (p.Gly484Glu), c.1597C>T (p.Arg533Cys) y c.1601G>A (p.Cys534Tyr). Finalmente, en aquellos pacientes que luego de la segunda etapa continuaron con genotipo incompleto o desconocido, se investigaron los restantes exones del gen *HEXB* por amplificación por PCR y secuenciación. Siempre que fue posible, una vez identificadas las mutaciones en los pacientes, se procedió a confirmar los hallazgos en los padres del paciente y otros familiares.

### 3.2.1 Investigación a nivel bioquímico

#### 3.2.1.1 Determinación de la actividad Hexosaminidasa en pacientes con sospecha de enfermedad de Sandhoff

Se estudiaron 34 pacientes con sospecha de Gangliosidosis GM2 en sus distintas variantes. A todos se les midió la actividad Hex B (parcial) y Hex total

en plasma. Se identificaron 5 pacientes con ES variante infantil y 1 uno con la variante juvenil (ver Tabla 23, valores en rojo). En todos los enfermos la actividad Hex total no supera el 5% confirmando la patología. Los valores enzimáticos obtenidos se resumen en la Tabla 23.

**Tabla 23. Actividad Hexosaminidasa en pacientes con sospecha clínica de GM2**

VARIANTE SOSPECHADA	Nº	S	EDAD	HEX B	%	HEX TOTAL	%	PACIENTES CONFIRMADOS
INFANTIL	1	F	26 d	208,85	76,50	759,45	121,88	-
	2	M	3 m	416,37	152,52	829,02	133,05	-
	3	M	5 m	831,94	304,74	1238,10	198,70	-
	4	F	8 m	291,62	106,82	771,31	123,79	-
	5	M	8 m	957,49	350,73	1381,90	221,78	-
	6	F	9 m	185,43	67,92	592,08	95,02	-
	7	F	9 m	<b>4,45</b>	<b>1,63</b>	<b>7,34</b>	<b>1,18</b>	<b>ES-1</b>
	8	M	9 m	159,38	58,38	580,04	93,09	-
	9	F	10 m	<b>2,04</b>	<b>0,75</b>	<b>15,62</b>	<b>2,51</b>	<b>ES-2</b>
	10	F	1a	268,89	98,50	833,50	133,77	-
	11	F	1 a 1 m	<b>1,69</b>	<b>0,62</b>	<b>9,84</b>	<b>1,58</b>	<b>ES-3</b>
	12	F	1 a 2 m	<b>1,47</b>	<b>0,54</b>	<b>13,40</b>	<b>2,15</b>	<b>ES-4</b>
	13	M	1 a 2 m	<b>2,53</b>	<b>0,93</b>	<b>8,24</b>	<b>1,32</b>	<b>ES-5</b>
	14	M	1 a 2 m	415,24	152,10	810,29	130,04	-
	15	M	1 a 3 m	368,58	135,01	734,65	117,90	-
	16	M	1 a 3 m	401,86	147,20	1017,83	163,35	-
	17	M	1 a 5 m	156,02	57,15	377,99	60,66	-
	18	M	1 a 5 m	193,45	70,86	507,89	81,51	-
	19	M	2 a	173,58	63,58	467,15	74,97	-
	20	M	2 a 9 m	258,57	94,71	630,17	101,13	-
JUVENIL	1	F	4 a	119,47	43,76	342,77	55,01	-
	2	M	5 a 7 m	<b>0,37</b>	<b>0,13</b>	<b>16,52</b>	<b>2,65</b>	<b>ES-6</b>
	3	M	7 a	644,35	236,03	850,32	136,47	-
	4	M	8 a	116,84	42,80	428,40	68,75	-
	5	M	14 a	154,50	56,59	462,72	74,26	-
	6	M	16 a	195,04	71,44	679,59	109,07	-
	7	M	18 a	154,93	56,75	398,45	63,95	-
	8	M	18 a	319,74	117,12	547,74	87,91	-
	9	F	18 a	252,38	92,45	666,55	106,97	-
ADULTO	1	M	27 a	105,34	38,59	343,21	55,08	-
	2	F	29 a	329,39	120,65	547,91	87,93	-
	3	M	38 a	200,75	73,54	551,89	88,57	-
	4	F	39 a	532,78	195,16	839,07	134,66	-
	5	M	51 a	230,22	84,33	560,43	89,94	-
<b>TOTAL</b>	<b>34</b>							

### 3.2.2 Determinación de la actividad Hexosaminidasa en familiares de pacientes con enfermedad de Sandhoff

Cuando fue posible se analizaron los padres del paciente, en algunos casos también se incluyeron otros familiares. Para los pacientes ES-4 y ES-5 no fue posible obtener muestras de sus padres. Los valores de actividad enzimática observados se detallan en la tabla 24. Entre los 10 individuos analizados, 6 resultaron portadores de la enfermedad y 2 no portadores. Los 2 restantes presentaron valores enzimáticos en el rango indeterminado o “zona gris”, su estado se confirmó posteriormente con el estudio molecular.

**Tabla 24. Actividad Hexosaminidasa en familiares de pacientes con enfermedad de Sandhoff**

<b>Nº</b>	<b>PARENTESCO</b>	<b>HEX B</b>	<b>%</b>	<b>HEX TOTAL</b>	<b>%</b>	<b>ESTADO</b>
1	Madre ES 1	70,96	25,99	290,37	46,60	PORTADOR
2	Madre ES 2	71,07	26,03	333,07	53,45	PORTADOR
3	Padre ES 2	88,14	32,29	523,25	83,98	PORTADOR
4	Madre ES 3	183,47	67,20	412,02	66,12	INDETERMINADO
5	Padre ES 3	119,13	43,64	301,18	48,34	PORTADOR
6	Tía ES 3	186,19	68,20	546,71	87,74	INDETERMINADO
7	Tío ES 3	216,36	79,25	644,95	103,51	NORMAL
8	Prima ES 3	332,20	121,69	710,10	113,96	NORMAL
9	Madre ES 6	50,62	18,54	290,74	46,66	PORTADOR
10	Padre ES 6	32,81	12,02	258,55	41,49	PORTADOR

### 3.2.3 Investigación a nivel molecular

#### 3.2.3.1 Estudio de la mutación más frecuente c.445+1G>A en pacientes con enfermedad de Sandhoff y familiares

Pacientes y familiares fueron estudiados a nivel molecular investigando en primera instancia la mutación más frecuente en el gen *HEXB*, c.445+1G>A. Sumado a los 6 pacientes previamente identificados con el diagnóstico bioquímico, se incluyeron 2 pacientes, ES-7 y ES-8, que ingresaron al centro exclusivamente para el análisis molecular (Tabla 25).

**Tabla 25. Genotipo para la mutación c.445+1G>A en pacientes con enfermedad de Sandhoff y familiares**

SUJETOS		RANGO ENZIMÁTICO	POSICIÓN c.445+1	
			GENOTIPO	ESTADO
<b>PACIENTES</b>	ES 1	ENFERMO	A/A	Homocigota
	ES 2		G/A	Heterocigota
	ES 3		A/A	Homocigota
	ES 4		A/A	Homocigota
	ES 5		A/A	Homocigota
	ES 6		G/G	No portador
	ES 7*		G/A	Heterocigota
	ES 8*		A/A	Homocigota
<b>FAMILIARES</b>	Madre ES 1	PORTADOR	G/A	Heterocigota
	Madre ES 2		G/G	No portador
	Padre ES 2		G/A	Heterocigota
	Padre ES 3		G/A	Heterocigota
	Madre ES 6		G/G	No portador
	Padre ES 6		G/G	No portador
	Madre ES 3	INDETERMINADO	G/A	Heterocigota
	Tía ES 3		G/G	No portador
	Tío ES 3	NO PORTADOR	G/G	No portador
	Prima ES 3		G/G	No portador
	Madre 7	SIN ESTUDIOS BIOQUIMICOS	G/A	Heterocigota
	Padre 7		G/G	No portador
	Madre 8		G/A	Heterocigota
Padre 8	G/A		Heterocigota	
Hermano 8	G/A		Heterocigota	

\* Estudios enzimáticos realizados en otro laboratorio

Cinco de los pacientes resultaron homocigotas para c.445+1G>A (genotipo completo), 2 heterocigotas (genotipo incompleto) y 1 paciente, ES-6, no portador de esta mutación (genotipo desconocido). En todos los familiares estudiados se observa correlación respecto al genotipo del enfermo.

En cuanto a la relación fenotipo bioquímico/genotipo, los familiares que presentaban valores enzimáticos no concluyentes, madre y tía de ES-3, pudieron ser confirmados, resultando portadora y no portadora para c.445+1G>A, respectivamente.

Los pacientes que resultaron con genotipo incompleto o desconocido, ES-2, ES-6 y ES-7, así como aquellos familiares que fueron identificados como portadores enzimáticos pero no portadores de la mutación c.445+1G>A, madre ES-2, madre ES-6, padre ES-6 y padre ES-7, fueron posteriormente estudiados por secuenciación parcial del gen *HEXB* para el análisis de otras 6 mutaciones detectadas en Argentina.

#### 3.2.4 *Análisis de las 6 mutaciones identificadas previamente en pacientes argentinos*

Se investigaron en los pacientes ES-2, ES-6 y ES-7 las 6 mutaciones identificadas previamente en Argentina: c.782\_785delCTTT (p.Ser261Cysfs\*13), c.1082+5G>A, c.1242+1G>A, c.1451G>A (p.Gly484Glu), c.1597C>T (p.Arg533Cys) y c.1601G>A (p.Cys534Tyr).

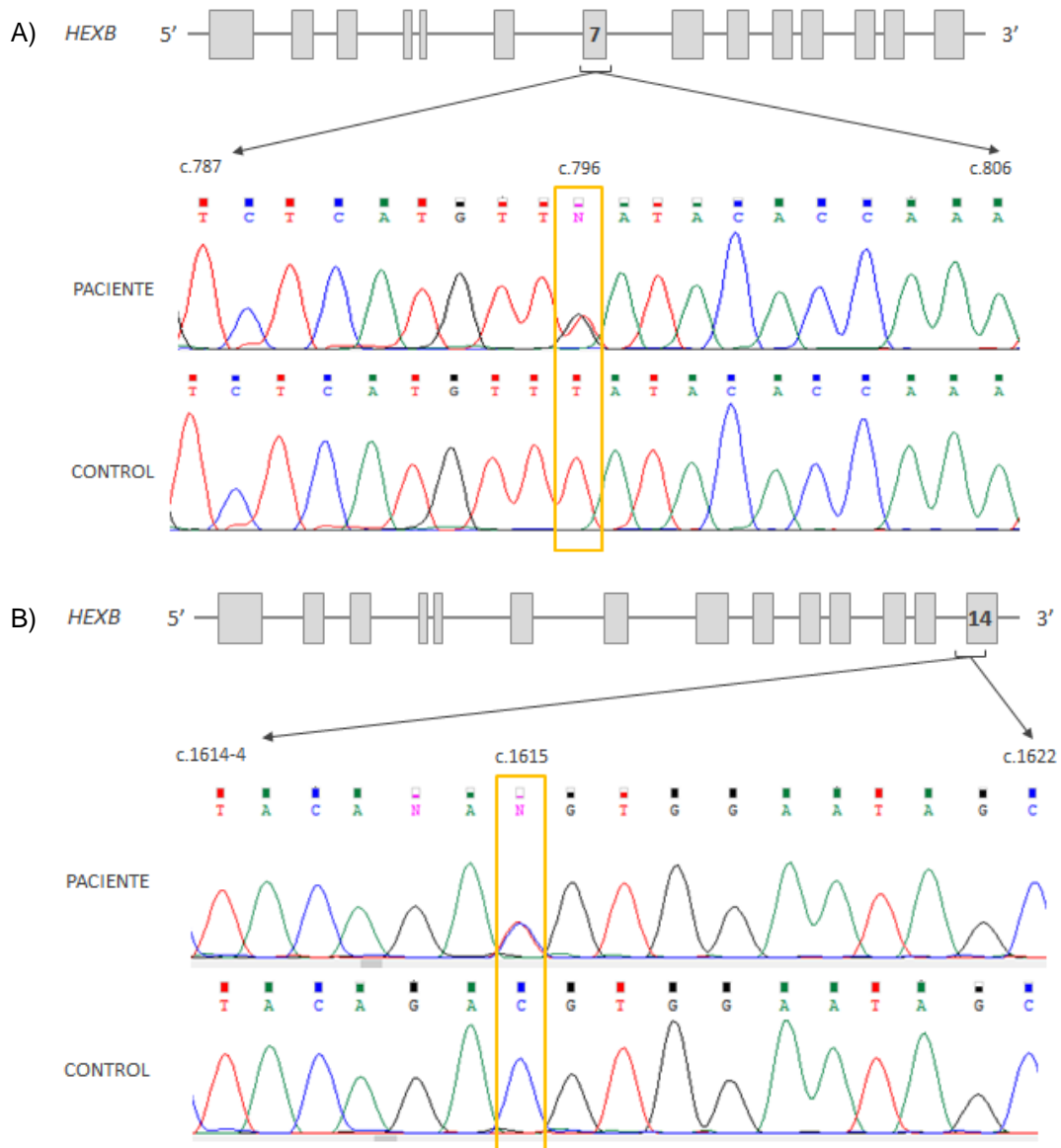
Los pacientes ES-6 y ES-7 resultaron no portadores de estas variantes, mientras que el paciente ES-2 resultó heterocigota para el cambio c.1082+5G>A. El genotipo obtenido para el paciente ES-2, que resultó heterocigota compuesto para c.445+1G>A y c.1082+5G>A, fue confirmado por vía materna y paterna, siendo estos portadores de c.1082+5G>A y c.445+1G>A, respectivamente.

#### 3.2.5 *Secuenciación del gen HEXB en pacientes con genotipo incompleto o desconocido*

En los pacientes ES-6 y ES-7, se llevó a cabo el análisis completo de todos los exones y regiones flanqueantes del gen *HEXB*, incluyendo las regiones UTR 5' y 3' y promotor esencial.

Paciente ES-6: Se detectaron 2 cambios de tipo *missense*: c.796T>G (p.Tyr266Asp) y c.1615C>T (p.Arg539Cys) (Fig. 28).

La variante c.796T>G (p.Tyr266Asp) corresponde a una sustitución de Timina por Guanina en la posición c.796 del exón 7 del gen *HEXB* que a nivel de la proteína produce el cambio de tirosina por ácido aspártico en la posición 266, afectando el sitio activo de la enzima.



**Figura 28. Mutaciones c.796T>G (p.Tyr266Asp) y c.1615C>T (p.Arg539Cys).** A) Electroferograma correspondiente a una región del exón 7. En la secuencia del paciente se observa el doble pico en posición c.796, cambio T>G en heterocigosis. B) Electroferograma correspondiente a una región del intrón 13 y exón 14. Doble pico en posición c.1615, cambio C>T en heterocigosis.

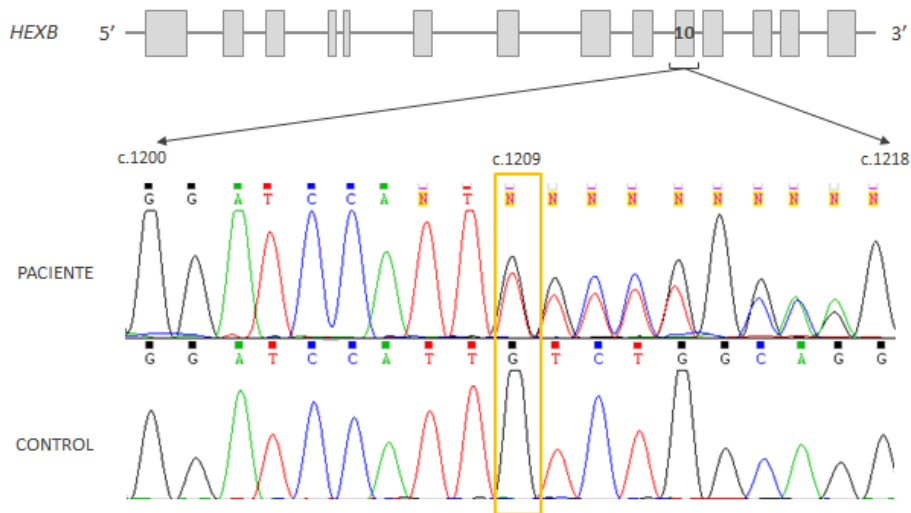
La variante c.1615C>T (p.Arg539Cys) es un cambio de cistina por timina en posición c.1615 del exón 14, el último del gen *HEXB*. Provoca la sustitución de una arginina por cisteína en la posición 539, implicada en la formación de puentes disulfuro de la proteína.

Ambas mutaciones han sido reportadas en la bibliografía científica, siendo p.Tyr266Asp identificada en pacientes con las variantes infantil y juvenil

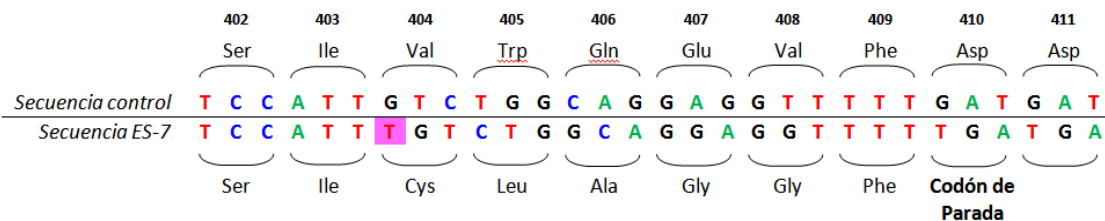


y p.Arg539Cys detectada en un único paciente para el que no existen datos acerca de la variante que presentaba.

**Paciente ES-7:** Se identificó la variante c.1209dupT (p.Val404Cysfs\*7), no reportada a nivel mundial. Este cambio se encuentra en el exón 10 del gen *HEXB* y se trata de la duplicación de una timina en la posición c.1209 (Fig. 29). Como consecuencia de esta mutación se produce un cambio en el marco de lectura que conduce a un producto proteico anormal, el cual posee un codón de terminación prematuro ubicado a siete aminoácidos a partir de la posición 404 (Fig. 30). Esta variante no fue detectada en el análisis de 400 cromosomas de individuos sanos.



**Figura 29. Mutación c.1209dupT (p.Val404Cysfs\*7).** Electroferograma correspondiente a una porción del exón 10 del gen *HEXB* en un control normal y en el paciente ES-7 donde puede observarse la duplicación en condición heterocigota de una timina (pico rojo) a partir de la posición c.1209 y el consecuente desfase en la secuencia.



**Figura 30. Efectos en la proteína de la mutación c.1209dupT (p.Val404Cysfs\*7).** Puede observarse la duplicación de la timina en el primer nucleótido del triplete que codifica para el aminoácido en posición 404 y el consecuente desfase en las secuencias finalizando con el codón de parada prematuro en posición 410.

### 3.2.6 Actualización de la frecuencia de mutaciones en los pacientes diagnosticados con enfermedad de Sandhoff en CEMECO

A partir de este trabajo de tesis, se incluyen 8 nuevos pacientes a la lista de 102 enfermos con ES previamente diagnosticados en CEMECO (Dodelson de Kremer y Molina de Levstein, 1980; Dodelson de Kremer et al., 1985; Kleiman et al., 1994; Oller Ramírez, 1996; Dodelson de Kremer y Oller de Ramírez, 2003; datos sin publicar).

En total se genotipificaron 66 pacientes que corresponden a 132 alelos. La mutación c.445+1G>A representa el 89,4% y el porcentaje restante corresponde a mutaciones de menor frecuencia detectadas en 1 o 2 alelos (Tabla 26).

**Tabla 26. Frecuencia de mutaciones causantes de enfermedad de Sandhoff a nivel local**

<b>NOMENCLATURA MUTACIÓN</b>		<b>ALELOS (N°)</b>	<b>FRECUENCIA (%)</b>
<b>Nivel ADN</b>	<b>Nivel Proteína</b>		
c.445+1G>A	-	118	89,4
c.1082+5G>A	-	2	1,5
c.1242+1G>A	-	2	1,5
c.1451G>A	p.Gly484Glu	2	1,5
c.782_785delCTTT	p.Ser261Cysfs*13	1	0,8
c.796T>G	p.Tyr266Asp	1	0,8
c.1209dupT	p.Val404Cysfs*7	1	0,8
c.1597C>T	p.Arg533Cys	1	0,8
c.1601G>A	p.Cys534Tyr	1	0,8
c.1615C>T	p.Arg539Cys	1	0,8
Alelos desconocidos		2	1,5
Total		132	100,0

### 3.2.7 Resumen de pacientes diagnosticados con enfermedad de Sandhoff

En el transcurso de este trabajo se diagnosticaron 8 pacientes con ES, investigados desde una perspectiva clínica, bioquímica y molecular. Entre ellos, 7 enfermos presentaron la variante infantil y 1 la forma juvenil de la enfermedad, siendo este el primer caso publicado en Argentina (Mugnaini et al., 2017). En cuanto a su origen, 5 pacientes provenían de la provincia de

Córdoba (1 de ellos de la zona de riesgo), 2 de Mendoza y 1 de Buenos Aires. Los resultados de la caracterización bioquímica y molecular se encuentran detallados en la Tabla 27.

**Tabla 27. Características principales de los pacientes diagnosticados con enfermedad de Sandhoff**

PACIENTE	FENOTIPO CLÍNICO	ORIGEN	% HEX TOTAL	GENOTIPO	
				ALELO MATERNO	ALELO PATERNO
ES-1*	Infantil	Córdoba capital	1,18	c.445+1G>A	c.445+1G>A
ES-2	Infantil	Córdoba capital	2,51	c.1082+5G>A	c.445+1G>A
ES-3	Infantil	Mina Clavero, Córdoba	1,58	c.445+1G>A	c.445+1G>A
ES-4	Infantil	Río Tercero, Córdoba	2,15	c.445+1G>A	c.445+1G>A
ES-5	Infantil	Córdoba capital	1,32	c.445+1G>A	c.445+1G>A
ES-6**	Infantil	Mendoza capital	-	c.445+1G>A	c.1209dupT (p.Val404Cysfs*7)
ES-7	Juvenil	Mendoza capital	2,65	c.1615C>T (p.Arg539Cys)	c.796T>G (p.Tyr266Asp)
ES-8**	Infantil	Morón, Buenos Aires	-	c.445+1G>A	c.445+1G>A

\* En este paciente sólo se pudo confirmar la presencia de la mutación en su madre.

\*\* No se cuenta con datos enzimáticos de estos pacientes.

### 3.3 Investigación de mutaciones causantes de enfermedad de Sandhoff en la población de Traslasierra de Córdoba

Se llevó a cabo un estudio molecular para investigar la frecuencia de las mutaciones c.445+1G>A, c.782\_785delCTTT, c.1242+1G>A, c.1082+5G>A, p.Gly484Glu, p.Cys534Tyr y p.Arg533Cys en la población de Traslasierra de Córdoba. Las mutaciones previamente mencionadas fueron identificadas en pacientes con ES diagnosticados en CEMECO entre los años 1970 y 2010. Para el análisis se utilizaron 200 muestras de sangre que fueron recolectadas en diferentes zonas de Traslasierra de Córdoba en el marco de un estudio poblacional realizado en CEMECO durante el periodo 2007-2008.

#### 3.3.1 Mutaciones detectadas en la muestra poblacional

Se realizó extracción de ADN y amplificación por PCR de regiones de interés del gen *HEXB* en las 200 muestras de sangre. El análisis para las mutaciones c.445+1G>A y c.782\_785delCTTT se realizó por ensayos de restricción mientras que las otras variantes se investigaron por PCR/secuenciación.

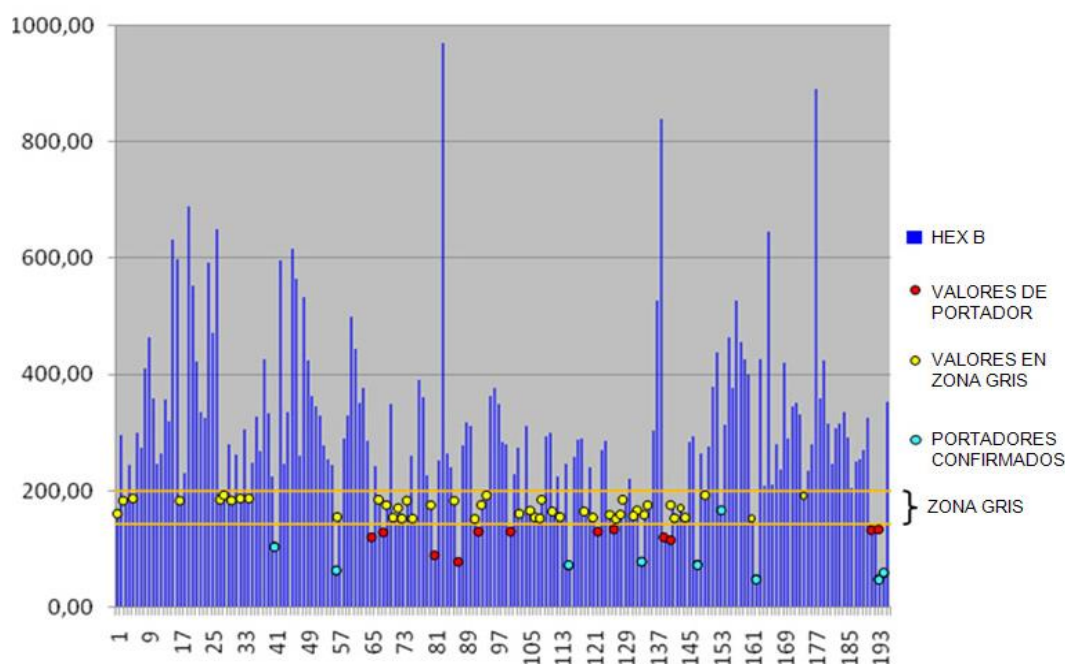
Como resultado del análisis se confirmaron 9 portadores de la mutación c.445+1G>A que representan un 4,5% del muestreo poblacional. Además, la mutación c.445+1G>A se detectó en el 100% de los heterocigotas, mientras que las otras variantes estudiadas no fueron detectadas en ningún individuo (Tabla 28).

**Tabla 28. Mutaciones detectadas en la muestra poblacional**

<b>VARIANTE</b>	<b>N° INDIVIDUOS</b>	<b>%</b>
<b>c.445+1G&gt;A</b>	<b>9</b>	<b>4,5</b>
p.Gly484Glu	0	0
p.Cys534Tyr	0	0
p.Arg533Cys	0	0
c.782_785delCTTT	0	0
c.1082+5G>A	0	0
c.1242+1G>A	0	0
Normal	191	95,5
<b>Total</b>	<b>200</b>	<b>100</b>

### 3.3.2 Comparación entre valores enzimáticos y moleculares de la muestra poblacional

En el estudio poblacional realizado entre 2007 y 2008 se investigaron los niveles de Hex B (parcial) y Hex total. Los valores obtenidos de actividad enzimática revelaron la existencia presuntiva de 20 portadores enzimáticos y 49 individuos con valores en el rango indeterminado o “zona gris”. Sin embargo, el estudio molecular realizado en este trabajo sólo corroboró la existencia de 9 de ellos, dejando 12 posibles portadores enzimáticos sin confirmar. Además, de los 9 heterocigotas para la mutación c.445+1G>A, 8 presentaron valores enzimáticos en el rango de portadores y 1 en la zona indeterminada o “zona gris” (Fig. 31).



**Figura 31. Actividad enzimática y portadores de c.445+1G>A en la muestra poblacional.** Las barras azules corresponden a los valores de actividad de Hex B de cada individuo (Rango portador enzimático= <140 nmoles/ml plasma/hora; Rango de “zona gris”= 140-200 nmoles/ml/hr; Rango no portador enzimático= >200 nmoles/ml/hr). Los puntos celestes representan aquellos individuos confirmados como portadores de la mutación c.445+1G>A.

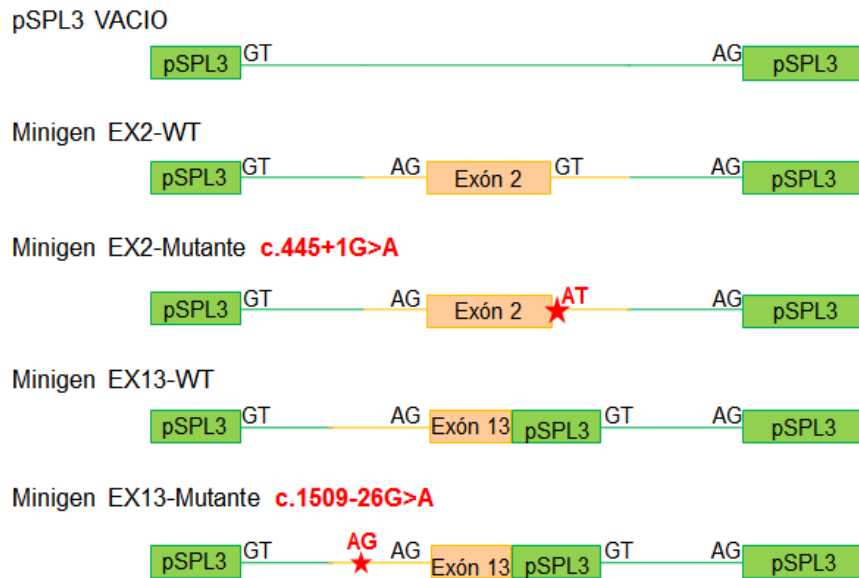
### 3.4 Ensayos *in vitro* en modelos de mutaciones intrónicas en el gen *HEXB*

Con el objetivo de obtener modelos *in vitro* de mutaciones causante de ES se generaron minigenes para dos variantes intrónicas frecuentes en el gen *HEXB*, c.445+1G>A y c.1509-26G>A. Los minigenes son un tipo de plásmidos que se crean artificialmente para que contengan porciones génicas específicas, incluyendo distintas variantes o mutaciones de interés. Cuando los minigenes son analizados en condiciones *in vitro*, permiten evaluar los efectos de tales variaciones o mutaciones en la proteína o en el proceso de corte y empalme.

Los modelos *in vitro* generados en este trabajo de tesis fueron utilizados posteriormente para ensayos funcionales y en el caso del minigen con la mutación c.445+1G>A se utilizó para evaluar el uso de variantes adaptadas de U1snRNA como estrategia terapéutica.

#### 3.4.1 Obtención de minigenes portadores de las mutaciones c.445+1G>A y c.1509-26G>A

Se insertaron secuencias de interés correspondientes al gen *HEXB* en el vector de expresión pSPL3 y se generaron 2 minigenes: EX2 y EX13. El primero contiene la secuencia completa del exón 2 junto a sus secuencias intrónicas flanqueantes y el otro, las secuencias de porciones del intrón 12 y del exón 13. A continuación, se introdujeron por mutagénesis dirigida las mutaciones c.445+1G>A y c.1509-26G>A en los minigenes EX2 y EX13, respectivamente, dando a lugar a 4 variantes: los minigenes EX2-WT y EX13-WT corresponden a las secuencias normales o *wild-type* mientras que EX2-MUT y EX13-MUT a los mutados. Las mutaciones introducidas en los minigenes mutados afectan sitios de corte y empalme, en EX2-MUT el sitio donador natural GT pasa a ser AT y en EX13-MUT se genera un nuevo sitio aceptor AG ubicado a 24 nucleótidos del comienzo del exón 13 (Fig. 32).



**Figura 32. Representación esquemática de los minigenes EX2 y EX13.** En color verde están representadas las secuencias correspondientes al vector pSPL3 (V), siendo los rectángulos las regiones exónicas y las líneas las intrónicas. Los rectángulos y líneas naranjas corresponden a las secuencias de interés insertadas, exónicas e intrónicas respectivamente. Las letras GT y AG refieren a los sitios donadores y aceptores que intervienen en el proceso de corte y empalme. Las estrellas rojas corresponden a las mutaciones introducidas. Nótese que en el minigen EX13 no existe un sitio donador GT natural, dado que solo se insertó el extremo 5' del exón.

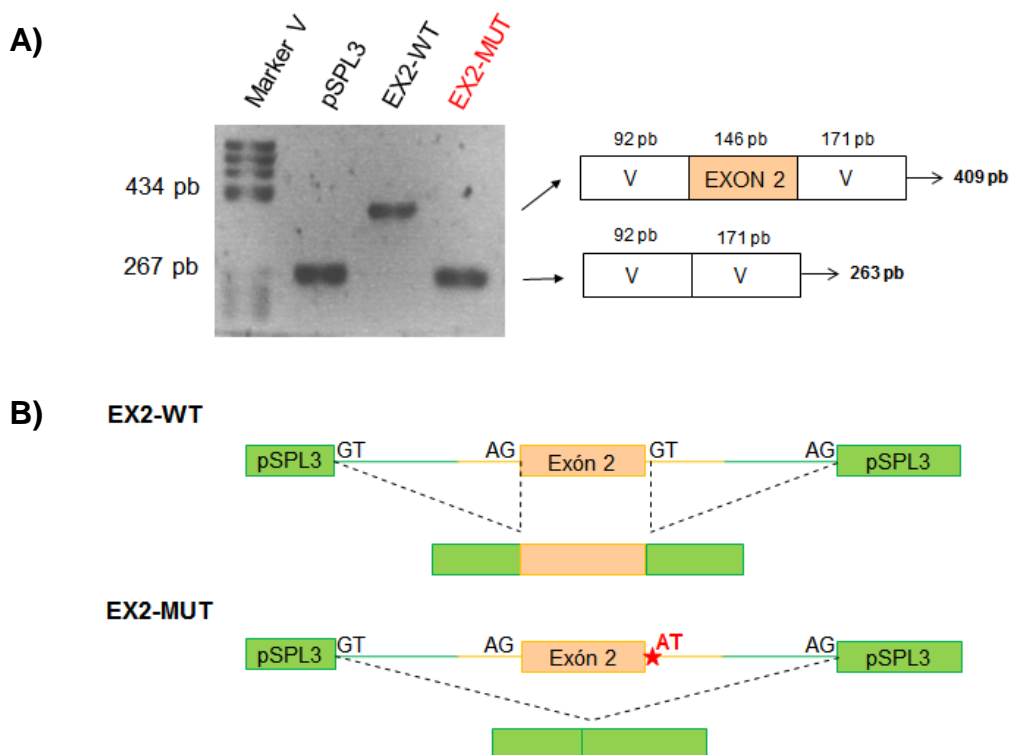
### 3.4.2 *Análisis funcional in vitro de las mutaciones intrónicas c.445+1G>A y c.1509-26G>A*

Una vez obtenidos los minigenes se procedió al análisis funcional. Todos los plásmidos fueron transfectados en células HEK293 y COS-7 y luego de 24 hs se evaluaron los perfiles transcripcionales mediante la extracción de ARN y RT-PCR.

El perfil del minigen EX2 en su variante wild-type resultó en una banda de aproximadamente 400 pb y en su versión mutada se observa una banda que ronda los 260pb, similar a la del vector pSPL3 vacío. El patrón observado es el mismo si se transfecta en células HEK293 o en COS-7. Luego de secuenciar los productos de PCR, confirmamos que la banda de EX2-WT de 409 pb corresponde a las porciones exónicas del vector pSPL3 (263 pb) sumado al exón 2 insertado (146 pb). En cambio, el minigen EX2-MUT expresa una banda que contiene únicamente los exones de pSPL3 (263 pb) a causa de

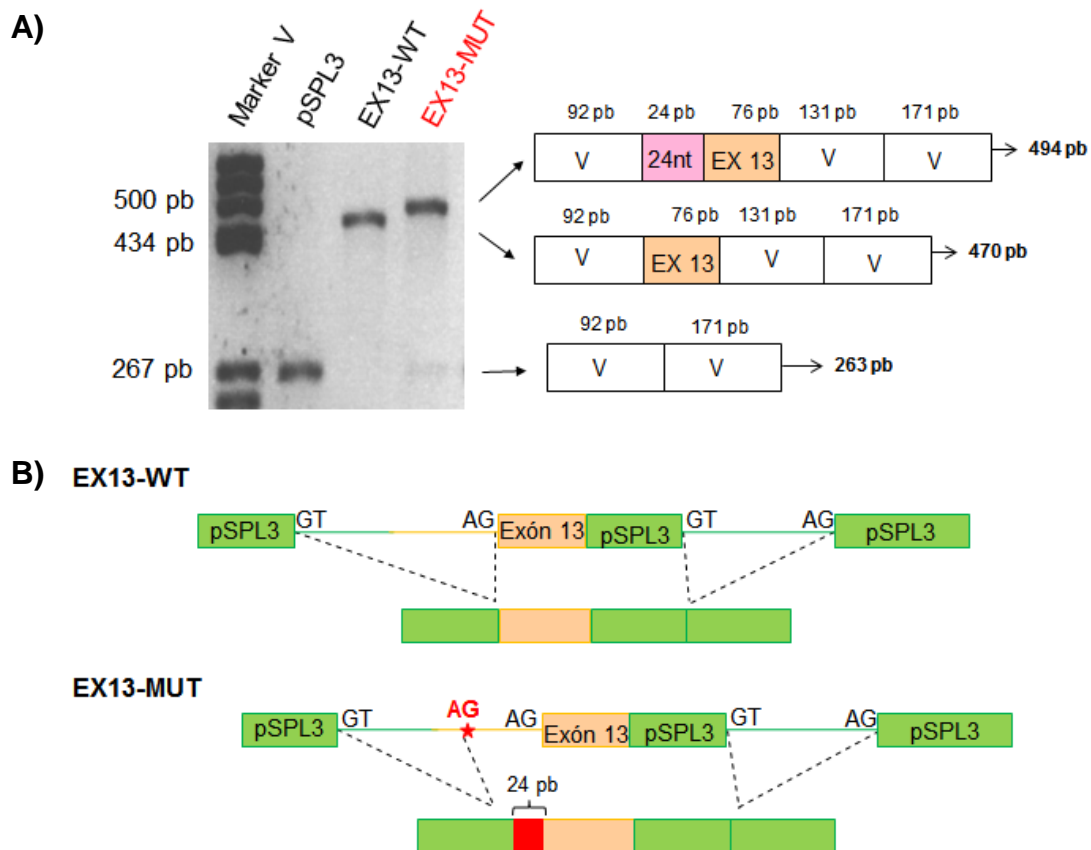
la mutación c.445+1G>A que afecta el sitio natural de *splicing* y provoca la pérdida completa del exón 2 (Fig. 33).

Por otra parte, el minigen EX13 expresa una banda cercana a los 500 pb, que en la versión *wild-type* es ligeramente de menor tamaño que la versión mutada. En este caso también se repite el mismo perfil transcripcional según sea el tipo celular transfectado. Luego de la secuenciación de los productos se confirma que EX13-WT expresa una banda de 470 pb que se compone de los exones de pSPL3 (263 pb) y de la porción del exón 13 insertada (76 pb). También contiene una porción exónica extra del vector pSPL3 (131 pb) que se fusiona con el exón 13 incompleto y aporta el sitio donador GT para el proceso de corte y empalme. Por otra parte, el minigen EX13-MUT expresa una banda ligeramente más grande (494 pb) que contiene la misma estructura que EX13-WT sumado a una región extra de 24 pb que es resultado del *splicing* anormal que causa la mutación c.1509-26G>A creando un nuevo sitio aceptor AG con mayor tendencia a empalmarse que el sitio aceptor natural (Fig. 34).



**Figura 33. Análisis funcional en el minigen EX2.** A) Perfil transcripcional del pSPL3 vacío y los minigenes EX2-WT y EX2-MUT. B) Representación esquemática del proceso de corte y empalme en los minigenes EX2-WT y EX2-MUT.

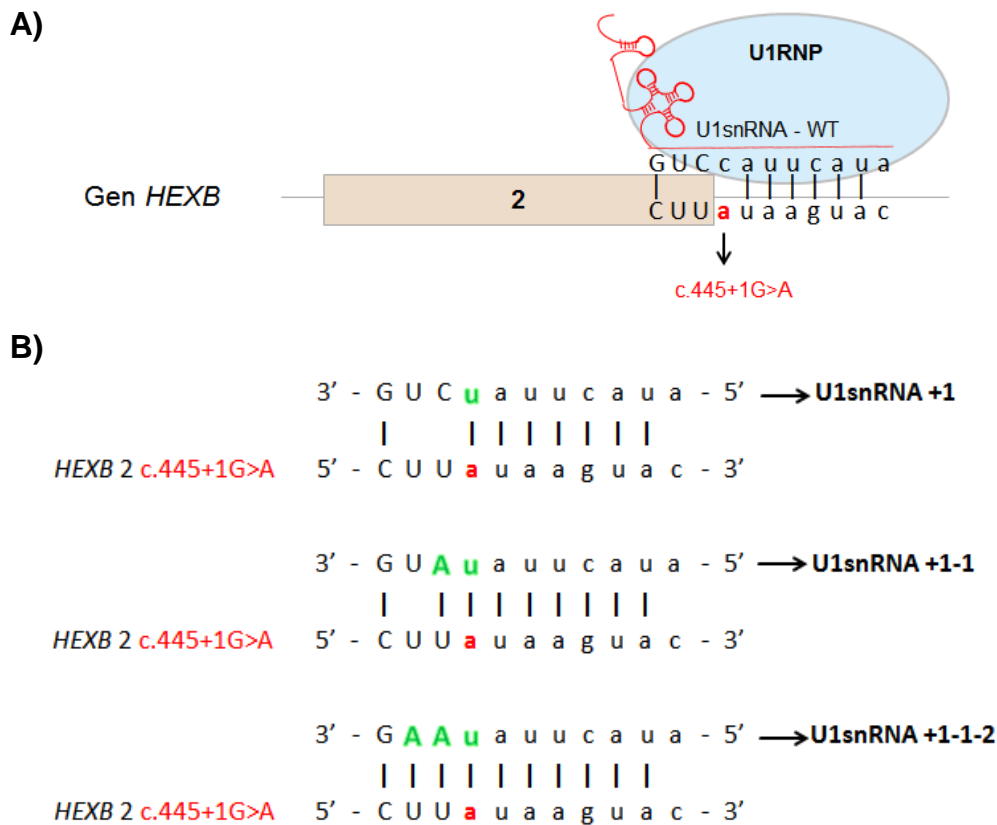




**Figura 34. Análisis funcional en el minigen EX13.** A) Perfil transcripcional del pSPL3 vacío y los minigenes EX13-WT y EX13-MUT. B) Representación esquemática del proceso de corte y empalme en los minigenes EX13-WT y EX13-MUT.

### 3.4.3 Obtención de variantes adaptadas de *U1snRNA*

Con el objetivo de evaluar el efecto de *U1snRNA* sobre la mutación c.445+1G>A, se prepararon mediante mutagénesis dirigida diferentes variantes de la secuencia *U1snRNA* normal o *wild type*, de manera que estas resulten complementarias a la porción de secuencia del exón e intrón 2 del gen *HEXB* que presenta el cambio de nucleótido G>A en la posición c.445+1. Se obtuvieron 3 variantes con grado creciente de complementariedad, *U1snRNA+1*, *U1snRNA+1-1* y *U1snRNA+1-1-2* (Fig. 35).



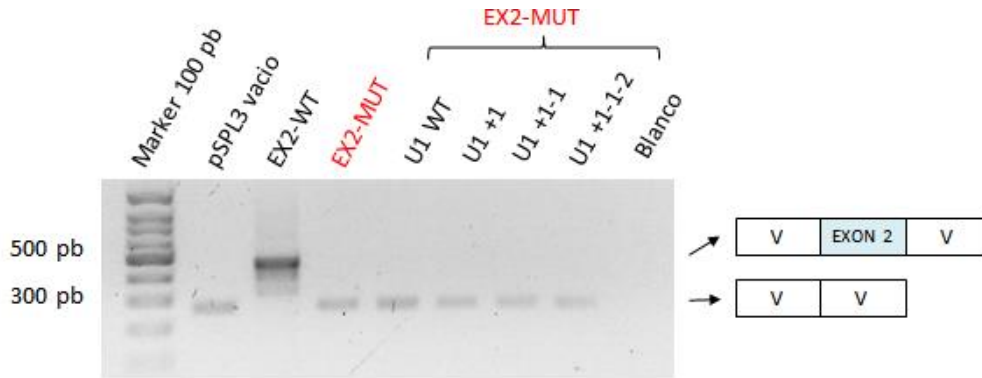
**Figura 35. Variantes de U1snRNA para la mutación c.445+1G>A.** A) Representación esquemática del sitio de unión de la ribonucleoproteína U1 a la secuencia del exón 2 e intrón 2 del gen *HEXB* que porta la mutación c.445+1G>A. Se observa como el cambio G>A elimina la unión con U1snRNA en la posición +1. B) Secuencia de las 3 variantes obtenidas de U1snRNA. En rojo se destaca la mutación c.445+1G>A y en verde los cambios introducidos experimentalmente en posición +1, -1 y -2.

#### 3.4.4 Ensayo terapéutico en modelo *in vitro* de la mutación c.445+1G>A

Se procedió con la co-transfección en líneas celulares del minigen EX2-MUT y de las variantes de U1snRNA previamente obtenidas, con el fin de evaluar si el aumento en la complementariedad podría tener un efecto corrector en el proceso de corte y empalme alterado por la mutación c.445+1G>A.

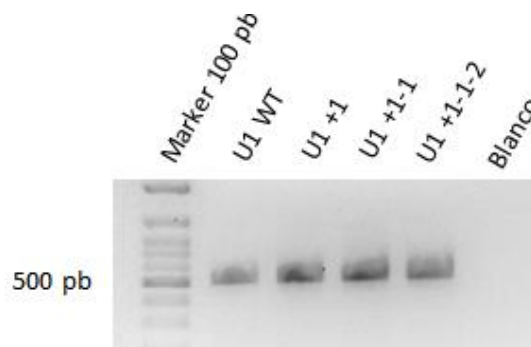
El perfil transcripcional obtenido nos demuestra que no se produce corrección, ya sea parcial o total, por parte de las variantes de U1snRNA. Es decir, en todos los casos que se co-transfectó se observa una banda cercana a los 300 pb que corresponde a las secuencias exónicas del vector pSPL3 sin el

exón 2 inserto, concluyendo que el proceso de corte y empalme no se lleva a cabo adecuadamente. El experimento fue llevado a cabo en reiteradas oportunidades, variando la concentración utilizada de variantes de U1snRNA entre 1-4  $\mu$ g y aumentando el tiempo de exposición en 24, 48 y 72 hs. El resultado siempre fue similar al obtenido en la Fig 36.



**Figura 36. Perfil transcripcional del minigen EX2-MUT co-transfectado con variantes U1snRNA.** Referencias carriles: 1: Marker 100 pb. 2: Control pSPL3 vacío. 3: Control minigen EX2-WT. 4: Control minigen EX2-MUT. 5-8: Transfección simultánea del minigen EX2-MUT y de las diferentes variantes de U1snRNA. 9:Blanco.

Por otra parte, para confirmar que la transfección de las variantes de U1 se realizó correctamente, se evaluó la presencia de los vectores mediante PCR con un cebador específico para el vector pG3U1 que contiene la secuencia de U1snRNA. En todos los casos se observa un banda cercana a los 500pb que confirma que la transfección fue adecuada (Fig. 37).



**Figura 37. Control de transfección de las variantes U1snRNA.** Referencias carriles: 1: Marker 100 pb. 2-5: variantes de U1snRNA. 6: Blanco.

## 4 DISCUSIÓN

### 4.1 Diagnóstico molecular de la fibrosis quística

En el marco del presente estudio se estandarizaron por primera vez en el Centro de Estudio de las Metabolopatías Congénitas (CEMECO), Facultad de Medicina (UNC), Hospital de Niños de Córdoba, técnicas de biología molecular para realizar el análisis completo de los 27 exones y regiones flanqueantes del gen *CFTR*. Esta metodología fue utilizada para el estudio de pacientes con FQ y patologías relacionadas al gen *CFTR* (*CFTR-RD*). En total se analizaron 17 pacientes, de los cuales 13 presentaron el fenotipo clásico de la enfermedad, 2 CBAVD y 2 con sospecha de algún tipo de *CFTR-RD*. Además, se detectaron 14 variantes diferentes, de las cuales 13 fueron mutaciones ya previamente caracterizadas y 1 variante, c.3254A>T (H1085L), resultó aún no reportada en la bibliografía (Tablas 19, 20 y 21).

#### 4.1.1 Variantes ya descritas identificadas en el gen *CFTR*

Dentro de las mutaciones previamente publicadas, podemos identificar distintos tipos. Por un lado, se encuentran las mutaciones causantes de FQ caracterizadas en detalle en la bibliografía científica que presentan alta frecuencia en la población en general, como F508del, R553X y 2789+5G>A (Cutting y Zeitlin, 2012). Por otra parte, también se detectaron mutaciones causantes de FQ con una frecuencia alélica moderada en la población en general, tal es el caso de 1717-8G>A, 1782delA, 3272-26G>A, H1054D, R1066C y Y1092X (Tizziano y Gartner, 2004; Dequeker et al., 2009; Schwarz et al., 2009; Cystic Fibrosis Centre at the Hospital for Sick Children in Toronto, 2011; US CF Foundation Johns Hopkins University, 2011).

Otro grupo de mutaciones detectadas, como 622-2A>G y 4374\_4374+1GG>TT, han sido descritas en casos clínicos muy puntuales, por lo que no existe gran cantidad de referencias bibliográficas acerca de ellas. El cambio 622-2A>G, fue publicado por primera vez por nuestro grupo de investigación (Oller Ramírez et al., 2006, 2008). Al ser una variante en posición conservada de corte y empalme -2, según las normas establecidas por la

*Human Genome Organization (HUGO)*, es considerada como mutación causante de patología y no requiere de estudios posteriores de validación (Richards et al., 2015). Posteriormente, esta mutación fue detectada en un único alelo de un paciente de origen chileno (Repetto et al., 2014). Por otro lado, c.4242\_4242+1delinsTT, es una variante muy particular ya que se trata de una doble deleción-inserción en el último nucleótido del exón 26 y en el primer nucleótido del intrón 26. Fue reportado por primera vez en la base de datos *CFTR1*, como el caso de un paciente francés detectado a través del *screening* neonatal. El paciente resultó heterocigota compuesto para c.4242\_4242+1delinsTT y F508del (Cystic Fibrosis Centre at the Hospital for Sick Children in Toronto, 2011). Mas recientemente, esta variante fue identificada en heterocigosis en un paciente de origen alemán con fenotipo CBAVD (Steiner et al., 2011). También fue publicado el caso de un paciente argentino con fenotipo clásico de FQ que presentó esta variante en combinación con F508del (Pepermans et al., 2016).

Por otra parte, mutaciones como P205S y D1152H se asocian con un amplio espectro clínico cuando se encuentran en combinación con una mutación causante de FQ (Dequeker et al., 2009; Girardet et al., 2015). Según la base de datos *CFTR2*, la variante P205S es clasificada como causante de FQ con alta probabilidad de presentar suficiencia pancreática (US CF Foundation Johns Hopkins University, 2011). Sin embargo, en la bibliografía científica ha sido relacionada tanto a un fenotipo leve de FQ con enfermedad pulmonar moderada como a presentaciones monosintomáticas de tipo CBAVD (Chillón et al., 1993; Bernardino et al., 2003). Estudios *in vitro* con proteínas mutantes para diferentes residuos de prolina en la proteína CFTR, indican que la variabilidad en el espectro fenotípico generado por la mutación P205S, podría deberse a que esta variante no solo afecta la conductividad del canal de cloro, si no también afecta al procesamiento y plegamiento de la proteína (Sheppard et al., 1996).

La variante D1152H se incluye dentro de las mutaciones de clase IV que afectan la conductancia del canal de cloro, manteniendo un nivel variable de actividad residual (Burgel et al., 2010). Inicialmente, se la asoció a FQ atípica

con enfermedad pulmonar leve, valores de test del sudor en rango intermedio y a presentaciones monosintomáticas como pancreatitis idiopática y *CBAVD* (Highsmith et al., 2005; Castellani y Cuppens, 2008; Dequeker et al., 2009). Otros autores publicaron casos de pacientes con enfermedad pulmonar severa y diagnóstico temprano a través del cribado neonatal (Mussaffi et al., 2006).

Un caso particular detectado en este trabajo fue el del alelo complejo [G576A; R668C] identificado en el paciente FQ-B3 en combinación con la mutación F508del en *trans*. Este alelo complejo presenta dos variantes: por un lado la mutación G576A que provoca una reducción leve a moderada en los niveles de la proteína CFTR normal (Pagani et al., 2003). Por otra parte, la variante R668C es considerada por si sola como un polimorfismo, es decir, sin efecto patológico (Pignatti et al., 1995). Sin embargo, algunos estudios señalan que la mutación G576A en asociación con R668C podría tener un efecto mayor que la G576A por si sola (Pagani et al., 2003). Según la base de datos *CFTR2*, ninguna de estas dos variantes causan FQ, sin embargo, indica que podrían estar asociadas a enfermedades relacionadas al gen *CFTR* (US CF Foundation Johns Hopkins University, 2011).

Por último, la variante H939R fue identificada en *trans* con la mutación 2789+5G>A en el paciente FQ-A12. Esta mutación fue identificada inicialmente en el año 1996 en combinación con la mutación F508del en un paciente francés que presentó FQ atípica con enfermedad pulmonar leve y suficiencia pancreática (Cystic Fibrosis Centre at the Hospital for Sick Children in Toronto, 2011). Más recientemente, se publicó el caso de 5 pacientes no relacionados que presentaron la mutación H939R formando un alelo complejo con la variante H949L en *cis* y otras mutaciones causantes de FQ en *trans*. En este caso, los fenotipos resultantes fueron de FQ clásica con enfermedad severa pulmonar e insuficiencia pancreática (Polizzi et al., 2011).

#### 4.1.2 Variante nueva c.3254A>T (H1085L)

La variante de tipo *missense* c.3254A>T (H1085L) se encontró en el paciente FQ-A6 en estado de heterocigosis y en combinación con la mutación c.490-2A>G (Tabla 19; Fig. 18). El cambio H1085L no se encuentra descrito

en las bases de datos internacionales *CFTR1* y *CFTR2* (Cystic Fibrosis Centre at the Hospital for Sick Children in Toronto, 2011; US CF Foundation Johns Hopkins University, 2011).

Siguiendo las normas establecidas por la *Human Genome Organization* (*HUGO*), se considera que esta variante tiene un potencial patogénico moderado (Richards et al., 2015). Esto es determinado principalmente por 3 razones: En primer lugar, la variante no fue detectada en los proyectos de análisis de secuencias poblacionales como *Exome Aggregation Consortium* (*EXAC*) o *1000 Genomes Project* (The 1000 Genomes Project Consortium, 2015; Lek et al., 2016). En segundo lugar, fue detectado en *trans* con otra mutación causante de FQ, c.490-2A>G. Finalmente, existe otra mutación ya descrita, c.3254A>G (H1085R), que afecta al mismo nucleótido y aminoácido, pero que en este caso se trata de una sustitución de adenina por guanina que tiene como consecuencia un cambio de histidina por arginina en la proteína *CFTR*. Según la base de datos *CFTR1* la mutación H1085R es considerada causante de FQ y fue identificada originalmente en un paciente japonés con FQ clásica (Yoshimura et al., 1999; Cystic Fibrosis Centre at the Hospital for Sick Children in Toronto, 2011).

#### 4.1.3 *Análisis computacional predictivo para variantes de efecto desconocido*

Se investigaron las variantes c.3254A>T (H1085L), c.79G>A (G27R) y c.829T>A (W277R) utilizando los programas bioinformáticos predictivos *SIFT*, *POLYPHEN* y *HSF* (Ver apartado 3.1.3).

El cambio nuevo detectado, c.3254A>T (H1085L), resultó potencialmente dañino según los *software* de análisis de los efectos sobre proteína *POLYPHEN* y *SIFT*. Sin embargo, *HSF*, que analiza efectos sobre el proceso de corte y empalme no arrojó ningún resultado positivo (Fig. 19, 20 y 21).

Analizando en detalle los resultados arrojados por el programa *SIFT*, puede observarse que según esta predicción, el único cambio de aminoácido que toleraría la proteína en posición H1085 sería por glicina, ácido aspártico y

asparagina. Dado que la histidina es un aminoácido con carga positiva, es razonable que la sustitución de ésta por leucina, aminoácido no polar, genere un efecto perjudicial para la estructura y/o función proteica. Incluso si comparamos la variante H1085L con H1085R, mencionada en el apartado 4.1.2 (Yoshimura et al., 1999), sería más probable que el cambio por leucina tenga un efecto mayor que si fuese por arginina, dado que ésta última es un aminoácido con carga positiva al igual que la histidina.

La variante c.79G>A (G27R) por otra parte, sería perjudicial para la proteína según los programas *SIFT* y *POLYPHEN*, y también de acuerdo a *HSF*, se vería afectado un sitio exónico potenciador del proceso de corte y empalme (*ESE*), así como sitios de unión de factores de *splicing* SF2/ASF y SC35 (Fig. 22, 23 y 24).

No es posible saber si los dos efectos, la modificación en la proteína o la alteración de los factores de *splicing*, afectan por igual al comportamiento de CFTR. Sin embargo, que ambos tipos de programas arrojen resultados positivos, es un indicador de que la variante tendría potencial como causante de la patología. Además, los *software* de análisis de secuencias proteicas, arrojan un resultado claro. Por un lado, *SIFT* indica que no hay ningún aminoácido que sería tolerado por el cambio de glicina, por otra parte, *POLYPHEN* arroja la puntuación máxima de 1/1, siendo ambos resultados esperables considerando que la glicina es el aminoácido de menor tamaño y su sustitución en general genera graves efectos sobre la estructura proteica (Brooks, 2002).

Por último, el análisis del cambio c.829T>A (W277R), también arrojó resultados que sugieren que la variante sería patogénica, tanto a causa de cambios en la estructura proteica como debido a alteraciones sobre el proceso de corte y empalme (Fig. 25, 26 y 27). *HSF* indicó, no solo la potencial alteración en un sitio *ESE*, sino también la pérdida de un sitio de unión a la proteína SC35 y la creación de dos sitios nuevos para las proteínas SRp55 y SF2/ASF. Por otra parte, *SIFT* sugiere que no existe ningún aminoácido que podría reemplazar al triptófano en posición 277 y *POLYPHEN* arroja el puntaje



máximo de 1/1. En este caso, el efecto sobre la estructura proteica como causa de la patología podría tener un peso mayor sobre la alteración del proceso de corte y empalme, dado que se trata del aminoácido triptófano que, al ser el de mayor tamaño, es el que presenta menores chances de ser reemplazado por otro (Brooks, 2002).

#### 4.1.4 *Relación genotipo-fenotipo en los pacientes estudiados*

De los 17 pacientes investigados, fue posible determinar el genotipo completo en 14 de ellos (Tablas 19 y 21). En todos los casos la correlación genotipo-fenotipo fue la esperada: aquellos pacientes que presentaron dos mutaciones clase I o II resultaron en una variante FQ clásica y aquellos con al menos una mutación de clase III, IV o V presentaron alguna forma de CFTR-RD. En nuestros pacientes, las variantes asociadas a un fenotipo atípico fueron D1152H, P205S y el alelo complejo [G576A; R668C], siendo esto comparable con otros casos clínicos publicados en la bibliografía que presentaron el mismo genotipo y presentación clínica (Pignatti et al., 1995; Bernardino et al., 2003; Pagani et al., 2003; Terlizzi et al., 2015).

El paciente FQ-A6 presentó un fenotipo severo de FQ y un genotipo con la mutación de *splicing* 622-2A>G y la mutación nueva, c.3254A>T (p.His1085Leu). Al ser 622-2A>G una mutación de clase I por afectar un sitio canónico de corte y empalme, es razonable pensar que la mutación nueva H1085L también anula la función proteica, generando una variante clásica de FQ.

Luego del estudio completo de todos los exones y regiones flanqueantes del gen *CFTR*, el paciente FQ-A2 continuó con genotipo incompleto (F508del/?) y en los pacientes FQ-A5 y FQ-A11 no pudo identificarse ninguna variante causante de FQ (Tabla 19). Algunos estudios señalan que en estos casos, la no detección de mutaciones no significa necesariamente el descarte de la patología, sino más bien, que se requiere de un análisis más profundo del gen *CFTR* para identificar la alteración genética (Bergougnoux et al., 2015a). Algunas técnicas como la amplificación de sondas dependiente de ligandos múltiples (por sus siglas en inglés, MLPA) o la secuenciación masiva de nueva

generación (NGS) permiten detectar mutaciones en regiones intrónicas profundas o en la zona del promotor, así como grandes deleciones o inserciones en el gen *CFTR* (Giuliani et al., 2010; Essawi et al., 2015).

Comparando el porcentaje de alelos no identificados en estudios previos en CEMECO respecto a lo logrado luego de este trabajo, hubo un descenso de 12,4% a 6,84%, lo que indica que la técnica de secuenciación génica exhaustiva utilizada en esta oportunidad permite mayor sensibilidad para detectar variantes génicas que las técnicas *SSCA* y *DGGE* utilizadas previamente (Oller Ramírez et al., 2006, 2008). Además, según el consenso establecido por la Sociedad Europea de Fibrosis Quística, entre el 1% a 5% de los alelos mutados entre los pacientes con FQ presentan alteraciones génicas de tipo grandes rearrreglos génicos y/o mutaciones en zonas intrónicas profundas o región promotora, por lo que sería esperable que gran parte del 6,84% de los alelos que aún restan sin identificar correspondan a este tipo de variantes (Castellani y Cuppens, 2008; The European Cystic Fibrosis Society, 2016).

#### 4.1.5 *Prevalencia de las mutaciones identificadas en el gen CFTR*

Al finalizar este trabajo fue posible actualizar las frecuencias de las mutaciones identificadas en los pacientes diagnosticados con FQ en CEMECO (Tablas 3 y 22). Si bien la frecuencia de la mutación más frecuente F508del se mantuvo en el mismo valor de 53,3%, se observaron variaciones en las mutaciones que presentan frecuencias entre 1-5%. En primer lugar, el porcentaje de alelos con N1303K y G542X varió mínimamente dado que en los pacientes investigados no se detectó ninguna de estas dos mutaciones. Sin embargo, la mutación R1066C ahora presenta la 4ta frecuencia más alta, equivalente a 2,50%, dado que se identificaron 3 nuevos alelos con esta variante que se suman a los 3 ya registrados en nuestro centro. La sustitución R1066C fue reportada previamente con mayor frecuencia en la población portuguesa y española, por lo que no es sorpresiva su detección en nuestra población que presenta un fuerte componente genético europeo y sobretodo de origen español (Casals et al., 1997). Sin embargo, cabe destacar que en otros

trabajos realizados a nivel molecular en pacientes con FQ argentinos, se ha detectado únicamente en 2 alelos en pacientes de provenientes de Buenos Aires y en ningún alelo en pacientes originarios de la provincia de Santa Fe y región central (Visich et al., 2002; Pepermans et al., 2016).

Las otras mutaciones que presentan frecuencias entre 1-2% no variaron significativamente. Sin embargo, si es llamativa la ausencia de las mutaciones W1282X y R1162X que en los pacientes con FQ diagnosticados en la provincia de Buenos Aires y Santa Fe, presentan una frecuencia relativamente alta de 2,73% y 2,4%, respectivamente (Visich et al., 2002; Pepermans et al., 2016).

Finalmente, en comparación con otros países latinoamericanos, continua existiendo gran variación en las frecuencias de las diferentes mutaciones, particularmente por la gran frecuencia de F508del que hay en Argentina, reportada en 58,6%, 56,6% y en el presente trabajo de 53,3% (Visich et al., 2002; Pepermans et al., 2016). Los países que presentan la segunda mayor frecuencia de F508del en Latinoamérica, son Brasil y Colombia, con un 43,1% y 41,3% (Pérez et al., 2007).

## 4.2 Diagnóstico bioquímico y molecular de la enfermedad de Sandhoff

En el período que comprendió este trabajo se diagnosticaron 8 pacientes con ES, 7 con la variante infantil y 1 con la juvenil. En 6 de ellos, se llegó al diagnóstico midiendo la actividad Hex parcial y total en plasma e investigando a nivel molecular el gen *HEXB*, mientras que en los 2 restantes, se investigó únicamente a nivel genético. Los resultados de la caracterización bioquímica y molecular se encuentran detallados en las Tablas 23 y 27.

### 4.2.1 Determinación enzimática de las Hexosaminidasas

Se analizaron 34 pacientes con sospecha de Gangliosidosis GM2 en sus distintas variantes. En los 6 pacientes diagnosticados con ES la actividad Hex total no superó el 5% confirmando la patología (Tabla 23).

Los valores de Hex observados en los pacientes con ES variante infantil se corresponde con lo publicado en la bibliografía científica, entre 1-15% de actividad Hex total (Mahuran, 1999; Gravel et al., 2001; Gort et al., 2012; Zampieri et al., 2012). Distintos autores señalan que la actividad residual observada en estos pacientes se debe a la actividad de la isoenzima Hex S que no se encuentra afectada en la ES (Ikonne et al., 1975; Beutler, 1979; Tropak et al., 2004).

En cuanto al paciente ES-6 que presentó la forma juvenil, los valores detectados de Hex Total correspondieron al 2.65% de actividad de la enzima. Este valor es comparable con el porcentaje de Hex publicado para otros pacientes juveniles que oscila entre 0,5-8,3% (Mahuran, 1999; Gort et al., 2012; Zampieri et al., 2012). El valor obtenido en el paciente ES-6, así como el rango de actividad publicado para pacientes juveniles, es similar a los valores detectados en pacientes infantiles, no pudiendo determinar el tipo de variante a través de la determinación enzimática (Hendriksz et al., 2004). Una posible explicación a esto es que los sustratos artificiales utilizados en la técnica de determinación enzimática (O'Brien et al., 1970), no sean lo suficientemente sensibles como para discriminar entre estos dos fenotipos bioquímicos.

#### 4.2.2 *Mutaciones ya descritas identificadas en el gen HEXB*

Los 8 pacientes diagnosticados con ES fueron estudiados a nivel molecular según una estrategia que constó de 3 etapas de complejidad creciente (Fig. 16).

Al cabo de la primer etapa, 5 de los 8 pacientes se definieron como homocigotas para la mutación más frecuente c.445+1G>A y 2 de ellos resultaron heterocigotas para este cambio (Tabla 25). El alelo c.445+1G>A fue identificado previamente como mutación fundadora asociada a los habitantes originarios de la zona de Traslasierra de Córdoba, por lo que era esperable detectarla con alta frecuencia entre los pacientes investigados (Kleiman et al., 1994, 1998; Oller Ramírez, 1996; Dodelson de Kremer y Oller de Ramírez, 2003).

Sin embargo, uno de los pacientes homocigotas para c.445+1G>A provenía de la provincia de Buenos Aires, y otro heterocigota de la provincia de Mendoza (Tabla 27). En ambos casos las familias no refirieron relación o parentesco con individuos originarios de la zona de riesgo en la provincia de Córdoba. Un hecho histórico que podría explicar este hallazgo, es que en los últimos 500 años las comunidades autóctonas que habitaron la zona de Traslasierra de Córdoba abandonaron el aislamiento geográfico a causa de la colonización española y del proceso de cambio generado por el mestizaje y la modernización (Lorca, 2008). Como resultado de este fenómeno, podría haberse generado un flujo génico que permitiese a la mutación c.445+1G>A migrar desde la zona de riesgo a otras regiones del país.

En los pacientes ES-2 y ES-6 se detectaron en heterocigosis las mutaciones c.1082+5G>A y c.1209dupT (p.Val404Cysfs\*7), respectivamente (Tabla 27). La variante c.1209dupT (p.Val404Cysfs\*7), resultó ser una mutación no descrita en la bibliografía (Ver apartado 4.2.3). En cambio, c.1082+5G>A corresponde al grupo de mutaciones que se identificaron previamente en pacientes argentinos (Zampieri et al., 2012). No existe reporte de esta mutación en pacientes de otros países, aunque si fue publicada una

variante en la misma posición pero con distinto cambio de nucleótido, c.1082+5G>C, en pacientes de origen griego chipriota (Furihata et al., 1999).

Por último, en el paciente que presentó la variante juvenil de la enfermedad, ES-7, se detectaron otras dos mutaciones tipo *missense* ya descritas en la bibliografía científica. El cambio Y266D fue registrado en 5 enfermos, de los cuales 3 se correspondieron con la forma infantil de la enfermedad y 2 con la variante juvenil (Maegawa et al., 2006; Gort et al., 2012; Gaignard et al., 2013). Por otra parte, el cambio R539C solo ha sido identificado en un paciente caucásico para el que no hay datos acerca de la edad de diagnóstico, forma clínica ni edad de fallecimiento (Gort et al., 2012).

#### 4.2.3 Variante nueva c.1209dupT (p.Val404Cysfs\*7)

El paciente ES-6 resultó heterocigota compuesto para los cambios c.445+1G>A y c.1209dupT (p.Val404Cysfs\*7), éste último aún no reportado en la bibliografía. Esta variante es una duplicación de una timina en la posición c.1209 del exón 10 que causa un cambio en el marco de lectura, un codón de terminación prematuro y un producto proteico trunco (Fig. 29 y 30).

De acuerdo a las reglas de la *Human Genome Organization (HUGO)*, las variaciones génicas que no generan producto proteico son consideradas causantes de patología y por tanto no requieren estudios funcionales de validación. Ejemplos de esto son las variantes que provocan cambios en el marco de lectura, codones de parada prematuros, alteración de sitios de corte y empalme en posiciones altamente conservadas  $\pm 1$  y  $\pm 2$ , codón de inicio y grandes deleciones o inserciones (Richards et al., 2015). Siguiendo estas normas, la variante c.1209dupT (p.Val404Cysfs\*7) que genera una proteína trunca puede ser considerada como una mutación causante de ES.

Sumado a lo expuesto anteriormente, la variante c.1209dupT no fue detectada en los proyectos de análisis de secuencias poblacionales como *Exome Aggregation Consortium (EXAC)* o *1000 Genomes Project*, ni en el muestreo poblacional realizado en este trabajo de tesis, donde se analizaron 400 cromosomas de individuos sanos provenientes de la zona de Traslasierra

de Córdoba (The 1000 Genomes Project Consortium, 2015; Lek et al., 2016; datos pendientes de publicación).

#### 4.2.4 Prevalencia de las mutaciones identificadas en el gen *HEXB*

A partir de lo realizado en este trabajo de tesis fue posible actualizar la frecuencia de alelos mutados en los pacientes con ES diagnosticados en CEMECO (Tabla 27). Investigaciones previas en nuestro grupo identificaron 7 mutaciones (c.445+1G>A, c.782\_785delCTTT, c.1082+5G>A, c.1242+1G>A, p.Gly484Glu, p.Arg533Cys y p.Cys534Tyr) y caracterizaron a c.445+1G>A como mutación fundadora en la zona de riesgo (Kleiman et al., 1994, 1998; Oller Ramírez, 1996; Dodelson de Kremer y Oller de Ramírez, 2003; Zampieri et al., 2012). Actualmente se identificaron 3 mutaciones más (p.Tyr266Asp, p.Val404Cysfs\*7 y p.Arg539Cys), ampliando aún más el espectro de alelos mutados en el gen *HEXB* en pacientes argentinos (Mugnaini et al., 2017; datos aún no publicados).

Por otra parte, el número de pacientes que portan la mutación c.445+1G>A continúa siendo significativo: 118 alelos que corresponden a un 89,4% del total (Tabla 26). Si bien respecto a datos previos la frecuencia de c.445+1G>A descendió de 98,7% a 89,4%, esta variante es la que sigue teniendo mayor frecuencia, estando esto asociado a su calidad de mutación fundadora (Kleiman et al., 1994, 1998; Oller Ramírez, 1996; Dodelson de Kremer y Oller de Ramírez, 2003).

El aumento del número de mutaciones en nuestro grupo de pacientes puede entenderse considerando por un lado, que en este trabajo se han estandarizado e implementado técnicas exhaustivas de análisis molecular que permiten mayor sensibilidad en la detección de variantes en el gen *HEXB*. Por otra parte, en este trabajo se estudiaron 3 pacientes derivados de otras provincias, lo que también podría explicar la presencia de mutaciones diferentes a aquellas previamente identificadas en pacientes de la zona de riesgo (Tabla 27).

#### 4.2.5 *Diagnóstico de los pacientes con enfermedad de Sandhoff variante infantil*

El rango de edad de diagnóstico en los pacientes con ES variante infantil fue entre 9 meses a 1 año y 2 meses de edad (Tabla 9). La confirmación diagnóstica mediante la determinación enzimática, así como el curso clínico observado en los enfermos con ES estudiados en este trabajo, se corresponde con lo reportado previamente por nuestro grupo y en la bibliografía científica en general, siendo esto un ejemplo más de la evolución homogénea que caracteriza a la ES en su forma más severa (Dodelson de Kremer y Molina de Levstein, 1980; Dodelson de Kremer et al., 1985; Gravel et al., 2001).

#### 4.2.6 *Diagnóstico de la variante juvenil de enfermedad de Sandhoff*

La ES en su forma juvenil es una patología poco frecuente a nivel mundial. En los últimos años se han publicado 39 casos de pacientes con diversos orígenes étnicos, entre ellos paquistaníes, japoneses, brasileros, italianos, españoles, franceses, canadienses y estadounidenses (Kytzia et al., 1984; Nakano y Suzuki, 1989; Mitsuo et al., 1990; Lee et al., 2003; Hendriksz et al., 2004; Maegawa et al., 2006; Gort et al., 2012; Pierson et al., 2012; Zampieri et al., 2012; Gaignard et al., 2013). En Argentina, si bien existe la población endogámica con alta incidencia de ES infantil, hasta ahora no había sido diagnosticado ningún paciente con ES juvenil (Dodelson de Kremer y Molina de Levstein, 1980; Dodelson de Kremer et al., 1985, 1987; Oller Ramírez, 1996).

Maegawa et al., en 2006, publicaron una revisión de la historia natural de las Gangliosidosis GM2 variante Juvenil (Enfermedades de Tay-Sachs y Sandhoff), analizando 21 casos nuevos y 134 pacientes previamente descriptos en la bibliografía. La edad de inicio de los síntomas para casos nuevos y para pacientes previamente publicados, se ubica en el rango de 2 a 15 años y entre 1 a 17 años, respectivamente. Los síntomas comunes descriptos fueron dificultad en la marcha, trastornos del habla y lenguaje, falta de coordinación, discapacidad intelectual y signos piramidales. Otros hallazgos clínicos identificados con menor frecuencia fueron debilidad muscular, incontinencia



urinaria y/o fecal, deformidades del pie, alteraciones psiquiátricas o de comportamiento, disfagia, signos extrapiramidales, pobre ganancia de peso, convulsiones y disminución visual. En el presente caso clínico, tanto la edad de inicio de síntomas como los hallazgos clínicos más comunes se corresponden con lo mencionado en el trabajo de Maegawa et al. Entre los signos menos frecuentes el paciente presentó alteraciones psiquiátricas y trastorno del espectro autista (Maegawa et al., 2006).

En los exámenes complementarios, Maegawa et al., destacan como hallazgos principales la atrofia tanto cerebelar como cerebral y cambios en la sustancia blanca subcortical observados en las imágenes de RMN (Maegawa et al., 2006). Si bien en el paciente no se observaron alteraciones cerebelares, si fue evidente la atrofia cerebral y alteración de la sustancia blanca. Por otra parte, la mancha rojo-cereza en la mácula de la retina, signo presente en casi todos los enfermos con Gangliosidosis GM2 infantil, no fue identificada en el paciente, coincidiendo con la mayoría de los casos clínicos juveniles reportados (Gravel et al., 2001; Hendriksz et al., 2004; Maegawa et al., 2006).

El diagnóstico confirmatorio se obtuvo con la determinación de la enzima Hex en plasma y mediante el análisis molecular del gen *HEXB* (Ver apartados 4.2.1 y 4.2.2). Dado que se diagnosticó un único paciente, la información disponible no es suficiente para establecer qué tipo de relación existe entre el genotipo identificado y el fenotipo resultante.

Finalmente, el análisis de todos los datos relevados, incluyendo información clínica, bioquímica y molecular, nos permitieron concluir que el paciente presentó la variante juvenil de la Enfermedad de Sandhoff, siendo el primer caso publicado en Argentina (Mugnaini et al., 2017).

#### 4.2.7 *Detección de portadores*

Dada la falta de una terapia efectiva en el tratamiento de la ES, la definición del estado de portador se convierte en una herramienta de gran importancia para el correcto asesoramiento a las familias de los pacientes. Se

analizó mediante estudios bioquímicos y moleculares a 15 familiares de los pacientes confirmados con ES (Tablas 24 y 25).

En la mayoría de los casos, hubo correlación entre el nivel de actividad de Hex y el estado de portador. Sin embargo, en 2 personas, madre y tía del paciente ES-3, los resultados enzimáticos arrojaron valores de actividad que se ubican en el rango indeterminado, también llamado zona gris (Dodelson de Kremer et al., 1987; Oller Ramírez, 1996). En estos 2 casos la investigación a nivel molecular resultó fundamental, permitiéndonos concluir que la madre, era portadora c.445+1G>A y la tía resultó no portadora de la mutación c.445+1G>A. En este último caso, la condición de portador no se puede descartar, dado que no han sido investigadas otras mutaciones que pudiese afectar al gen *HEXB*, particularmente aquellas que fueron previamente identificadas en pacientes argentinos (Zampieri et al., 2012).

### **4.3 Investigación de mutaciones causantes de enfermedad de Sandhoff en la población de Traslasierra de Córdoba**

Se investigaron las mutaciones c.445+1G>A, c.782\_785delCTTT, c.1242+1G>A, c.1082+5G>A, p.Gly484Glu, p.Cys534Tyr y p.Arg533Cys en 200 muestras de individuos provenientes de la zona de Traslasierra. Los resultados fueron comparados con los valores de actividad Hex obtenidos en un estudio previo realizado en CEMECO entre los años 2006 y 2007 (Fig. 12).

#### *4.3.1 Análisis de las mutaciones detectadas en la muestra poblacional*

Se identificaron 9 individuos heterocigotas para la mutación c.445+1G>A, mientras que el resto de las mutaciones estudiadas no fueron detectadas en ningún individuo (Tabla 28). Esto sugiere que la frecuencia de estas nuevas mutaciones se encuentra en porcentajes muy bajos en la población de riesgo. Es posible que la baja frecuencia de estas variantes se deba a que su aparición en la población de la zona de riesgo haya sido relativamente reciente. Otra posibilidad, es que los individuos portadores de estos cambios estén limitados en regiones específicas dentro de la zona de Traslasierras que no hayan sido contempladas en el estudio poblacional. Además, estos datos confirman la prevalencia del cambio c.445+1G>A y su rol como mutación fundadora en la zona de riesgo (Kleiman et al., 1994, 1998; Oller Ramírez, 1996; Dodelson de Kremer y Oller de Ramírez, 2003).

#### *4.3.2 Comparación entre resultados enzimáticos y moleculares*

Estudios bioquímicos previos realizados en las 200 muestras poblacionales, revelaron la existencia presuntiva de 20 portadores enzimáticos y 49 individuos con valores en la zona de solapamiento (Fig. 12).

Las primeras investigaciones a nivel poblacional en la zona de Traslasierra de Córdoba, estimaron la existencia de 1 heterocigota por cada 16 a 29 individuos (Dodelson de Kremer et al., 1987; Oller Ramírez, 1996; Dodelson de Kremer y Oller de Ramírez, 2003). De esto se desprende que en 200 muestras, se estima la presencia de entre 7 a 13 portadores de ES. Sin

embargo, los 20 portadores detectados a nivel enzimático entre las 200 muestras no coinciden con el patrón previamente establecido.

Es sabido que las Hex, particularmente la Hex A, son sensibles a variaciones en la temperatura, así como a otros factores propios del individuo como diabetes, cáncer, embarazo, afectación renal, ingesta de anticonceptivos, alcohol, cambios circadianos, etc. (O'Brien et al., 1970; Navon y Adam, 1990; Casal et al., 2005; Waszkiewicz et al., 2008; Borzym-Kluczyk et al., 2009; Pagon, Adam, 2011). Por tanto, una posible explicación a la detección de un número mayor de portadores, podría ser que las muestras hayan sufrido variaciones de temperatura durante su colecta en la zona de Traslasierra que provocó una disminución en la actividad de las Hex. Otras posibilidades son que las variaciones en la actividad enzimática sean a causa de factores propios de cada individuo, como los mencionados previamente, o que estos individuos sean portadores de otras mutaciones no estudiadas en el muestreo poblacional.

A diferencia de los resultados a nivel enzimático, los 9 portadores detectados a nivel molecular coincidieron con la frecuencia de portadores de la ES previamente establecida, en el rango de 7 a 13 portadores de ES en 200 muestras de individuos (Dodelson de Kremer et al., 1987; Oller Ramírez, 1996). Sumado a esto, la no detección de las otra mutaciones apoya aún más la hipótesis que la presencia de 20 portadores presuntivos no sería real, si no, un valor sobreestimado a causa de alteraciones o variaciones propias de la muestras. Finalmente, estos resultados permiten confirmar la importancia que radica en la investigación a nivel molecular, no solo para el diagnóstico de pacientes, sino también, para el estudio o confirmación del estado de portador enzimático en individuos sanos.

#### **4.4 Ensayos *in vitro* en modelos de mutaciones intrónicas en el gen *HEXB***

Se obtuvieron 2 modelos *in vitro* de mutaciones causante de ES, uno para la mutación más frecuente en Argentina, c.445+1G>A, y otro para una de las mutación más frecuentes en el mundo, c.1509-26G>A (Fig. 32). Se realizaron estudios funcionales para analizar ambos minigenes en comparación con sus versiones no mutadas (Fig. 33 y 34). Se llevaron a cabo experimentos para evaluar el uso de variantes adaptadas de U1snRNA como estrategia terapéutica sobre la mutación más frecuente en la zona de Traslasierra de Córdoba, c.445+1G>A (Fig. 36).

##### **4.4.1 *Minigenes modelos de las mutaciones c.445+1G>A y c.1509-26G>A***

En los últimos 15 a 20 años, los modelos celulares *in vitro* para el análisis de variantes que afectan el *splicing* se volvieron herramientas de gran utilidad en el campo de la biología molecular y el diagnóstico genético. Numerosas publicaciones documentan la utilidad de los minigenes aplicados al análisis de mutaciones causantes de fibrosis quística, neurofibromatosis tipo I, Síndrome de Lynch, Hipotiroidismo congénito, entre otras (Baralle et al., 2003; Bonnet et al., 2008; Dujardin et al., 2011b; van der Klift et al., 2015; Belforte et al., 2016). En el presente trabajo, se logró la obtención de minigenes para dos mutaciones de gran importancia a nivel local y mundial, c.445+1G>A y c.1509-26G>A, respectivamente (Fig. 32).

El perfil transcripcional observado en estos vectores mutados es comparable a lo descrito previamente en células de pacientes con ES (Nakano y Suzuki, 1989; Brown et al., 1992). Para el caso de la mutación c.445+1G>A, estudios previos en fibroblastos de pacientes, reportaron que este cambio provoca un ARNm indetectable, sin especificar exactamente cuál es el perfil transcripcional causado (Brown et al., 1992). Por otra parte, una de las limitaciones del uso de minigenes es la dificultad de insertar grandes secuencias de ADN que permitan analizar la secuencia completa del ARNm (Desviat et al., 2012). Teniendo en cuenta esto, sabemos que el minigen obtenido como modelo de c.445+1G>A no contiene la secuencia completa para

codificar el ARNm de *HEXB*, sin embargo, la pérdida del exón 2 observada en el vector puede considerarse representativo de la no detección del ARNm observada en células de pacientes.

El minigen que porta la variante c.1509-26G>A, está formado por parte del exón 12, exón 13 y toda la secuencia del intrón 12, que solo consiste en 124 pb. El cambio de G>A en posición -26 del intrón 12, genera un sitio receptor 3' críptico causante de una inserción entre los exones 12 y 13 del ARNm. Tanto en el perfil transcripcional del minigen obtenido en este trabajo, como en los trabajos previos en las células del paciente, fue posible detectar esta secuencia extra de 24pb (Nakano y Suzuki, 1989).

En conclusión, los minigenes obtenidos para las variantes c.445+1G>A y c.1509-26G>A, resultan funcionales y representativos como modelos de mutaciones *in-vitro* de la ES y, por tanto, podrán resultar útiles en futuras investigaciones, particularmente aquellas que persigan fines terapéuticos.

#### 4.4.2 *Ensayo terapéutico en modelo in vitro de la mutación c.445+1G>A*

Se generaron 3 variantes de U1snARN con grado creciente de complementariedad a la mutación c.445+1G>A y se llevaron a cabo ensayos para evaluar el efecto de estas U1snARN adaptadas al modelo *in vitro* de la mutación c.445+1G>A (Fig. 35 y 36). No se observó corrección, ya sea parcial o total, por parte de las variantes de U1snRNA sobre la mutación c.445+1G>A (Fig. 36).

Los ensayos con variantes de U1snRNA adaptadas iniciaron a comienzos de los años 2000 a partir de un trabajo en mutaciones de *splicing* causantes ataxia-telangiectasia (Pagani et al., 2002). A partir de ese momento, se publicaron numerosos trabajos con variantes U1snARN y numerosos autores reportaron la corrección del proceso de corte y empalme a nivel *in vitro* causado por mutaciones en posiciones -2, -1, +3, +4, +5 y +6 (Susani et al., 2004; Buratti et al., 2006; Pinotti et al., 2009, 2008; Le Guédard-Méreuze et al., 2009; Incitti et al., 2010; Balestra, 2011; Sánchez-Alcudia et al., 2011; Schmid

et al., 2011; Glaus et al., 2011; Alanis et al., 2012; Cazzella et al., 2012; Goracznik et al., 2013; Balestra et al., 2014; van der Woerd et al., 2015).

En general, se considera como regla que las mutaciones en sitios altamente conservados de *splicing*, posiciones -1, -2, +1, +2, no pueden ser reparados por esta estrategia terapéutica. Sin embargo, Matos et al., en el año 2014, publicaron que luego del tratamiento con variantes de U1snRNA, fue posible la corrección de una mutación en posición +1 causante de la enfermedad de San Filipo. A diferencia del resto de los ensayos, que fueron realizados en modelos *in vitro* tipo minigen, este resultado se obtuvo luego de un tratamiento con U1snRNA adaptadas sobre células de un paciente homocigota para la mutación c.234+1G>A. En este mismo trabajo, se realizaron ensayos para otras mutaciones en posición +1 causantes de la enfermedad de Sanfilippo, no pudiendo obtener los mismos resultados favorables (Matos et al., 2014).

Matos et al. concluyeron que el éxito de la estrategia terapéutica sobre mutaciones en posición +1 depende en gran parte de las secuencias flanqueantes a la posición en cuestión y particularmente en la presencia de un sitio "GT" adicional en la región 5' que pueda ser utilizado alternativamente (Matos et al., 2014).

Teniendo en cuenta lo mencionado previamente, es posible que el fracaso en la aplicación de esta estrategia terapéutica sobre el minigen modelo de la mutación causante de ES, c.445+1G>A, se deba, en parte, a que el contexto en la secuencia de la región 5' no sea el adecuado para permitir una corrección en el *splicing* utilizando esta estrategia. Por otra parte, también podría afectar el hecho que los ensayos no pudieron ser realizados sobre células de un paciente.

Finalmente, y pese a los resultados no favorables obtenidos luego de estos ensayos, cabe destacar la importancia de investigar distintas estrategias terapéuticas para la ES, y particularmente para la mutación c.445+1G>A, causante de la alta incidencia de ES en la población de Traslasierra de Córdoba. En perspectiva, nuevas investigaciones con tratamientos U1snRNA

podrían ser aplicados sobre células de pacientes homocigotas para c.445+1G>A, o incluso, podría considerarse la investigación de nuevas estrategias terapéuticas aplicadas en los modelos *in vitro* obtenidos en este trabajo.



## 5 CONCLUSIONES

- Se identificó el genotipo completo en 14 de 17 de los pacientes con fibrosis quística investigados a nivel molecular.
- Se detectaron 14 mutaciones diferentes del gen *CFTR*, 13 previamente caracterizadas.
- Se identificó 1 variante nueva en el gen *CFTR*, c.3254A>T, p.His1085Leu.
- De acuerdo al análisis predictivo computacional, las variantes c.79G>A (G27R) y c.829T>A (W277R) son potencialmente perjudiciales para la proteína CFTR.
- Se diagnosticaron 8 pacientes con enfermedad de Sandhoff, caracterizados clínica, bioquímica y molecularmente.
- Se registró por primera vez en Argentina 1 paciente con enfermedad de Sandhoff variante juvenil.
- Se detectaron 5 variantes diferentes en el gen *HEXB*, 9 previamente caracterizadas.
- Se identificó 1 variante nueva en el gen *HEXB*, c.1209dupT (p.Val404Cysfs\*7).
- Entre los 200 individuos sanos originarios de la zona de Traslasierra de Córdoba se identificaron 9 portadores de la mutación c.445+1G>A, confirmándose como el cambio causante de enfermedad de Sandhoff más frecuente en Argentina.
- Se generaron dos minigenes que contienen las mutaciones c.445+1G>A y c.1509-26G>A, causantes de enfermedad de Sandhoff.
- El análisis funcional *in-vitro* demostró que los minigenes son representativos del efecto de las mutaciones a nivel *in-vivo*, resultando en modelos útiles para el estudio de la enfermedad.
- Se obtuvieron variantes de U1snARN complementarias a la secuencia mutada del exón 2 del gen *HEXB*.
- El tratamiento con U1snARN adaptadas no tiene un efecto corrector en el proceso de corte y empalme alterado por la mutación c.445+1G>A.

## 6 BIBLIOGRAFIA

- Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, Kondrashov AS, Sunyaev SR. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods*. 2010;7:248-249
- Alanis EF, Pinotti M, Mas AD, Balestra D, Cavallari N, Rogalska ME, Bernardi F, Pagani F. An exon-specific U1 small nuclear RNA (snRNA) strategy to correct splicing defects. *Hum Mol Genet*. 2012;21:2389-2398.
- Alteen MG, Oehler V, Nemč Ovič Ova I, Wilson IBH, Vocadlo DJ, Gloster TM. Mechanism of Human Nucleocytoplasmic Hexosaminidase D. *Biochemistry*. 2016;55:2735-2747
- Anirban M. Diseases of infancy and childhood. En: Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease, 9th ed. (Kumar VK, Abbas A, Aster JC, eds), pp 451-482. Philadelphia: Elsevier/Saunders.
- Balestra D. Modified U1snR as an innovative therapeutic strategy for inherited coagulation factor deficiencies. TESIS. 2011;
- Balestra D, Faella a., Margaritis P, Cavallari N, Pagani F, Bernardi F, Arruda VR, Pinotti M. An engineered U1 small nuclear RNA rescues splicing-defective coagulation F7 gene expression in mice. *J Thromb Haemost*. 2014;12:177-185.
- Baralle M, Baralle D, De Conti L, Mattocks C, Whittaker J, Knezevich A, Ffrench-Constant C, Baralle FE. Identification of a mutation that perturbs NF1 agene splicing using genomic DNA samples and a minigene assay. *J Med Genet*. 2003;40:220-222
- Belforte FS, Citterio CE, Testa G, Olcese MC, Sobrero G, Miras MB, Targovnik HM, Rivolta CM. Compound heterozygous DUOX2 gene mutations (c.2335-1G>C/c.3264\_3267delCAGC) associated with congenital hypothyroidism. Characterization of complex cryptic splice sites by minigene analysis. *Mol Cell Endocrinol*. 2016;419:172-184

- Belur LR, Temme A, Podetz-Pedersen KM, Riedl M, Vulchanova L, Robinson N, Hanson LR, Kozarsky KF, Orchard PJ, Frey II WH, Low WC, McIvor RS. Intranasal AAV Mediated Gene Delivery and Expression of Human Iduronidase in the CNS: A Non-invasive and Effective Approach for Prevention of Neurologic Disease in Mucopolysaccharidosis Type I. *Hum Gene Ther.* 2017;hum.2017.187
- Bergougnoux A, Taulan-Cadars M, Claustres M, Raynal C. New Molecular Diagnosis Approaches — From the Identification of Mutations to their Characterization. En: *Cystic Fibrosis in the Light of New Research*, pp 201-231
- Bergougnoux A, Viart V, Miro J, Bommart S, Molinari N, des Georges M, Claustres M, Chiron R, Taulan-Cadars M. Should diffuse bronchiectasis still be considered a CFTR-related disorder? *J Cyst Fibros.* 2015b
- Bernardino ALF, Lima CE, Zatz M. Analysis of mutations in the cystic fibrosis transmembrane regulator (CFTR) gene in patients with obstructive azoospermia. *Genet Mol Biol.* 2003;26:1-3
- Berns KI, Muzyczka N. AAV: An Overview of Unanswered Questions. *Hum Gene Ther.* 2017;28:308-313
- Beutler E. The biochemical genetics of the hexosaminidase system in man. *Am J Hum Genet.* 1979;31:95-105.
- Bikker H, van den Berg FM, Wolterman R a., de Vijlder JJM, Bolhuis P a. Demonstration of a Sandhoff disease-associated autosomal 50-kb deletion by field inversion gel electrophoresis. *Hum Genet.* 1989;81:287-288.
- Bikker H, van den Berg FM, Wolterman R a., Kleijer WJ, de Vijlder JJM, Bolhuis P a. Distribution and characterization of a Sandhoff disease-associated 50-kb deletion in the gene encoding the human  $\beta$ -hexosaminidase  $\beta$ -chain. *Hum Genet.* 1990;85:327-329.
- Bolhuis P a, Ponne NJ, Bikker H, Baas F, Vianney de Jong JM. Molecular basis of an adult form of Sandhoff disease: substitution of glutamine for arginine

at position 505 of the beta-chain of beta-hexosaminidase results in a labile enzyme. *Biochim Biophys Acta*. 1993;1182:142-146.

Bombieri C et al. Recommendations for the classification of diseases as CFTR-related disorders. *J Cyst Fibros*. 2011;10:S86-S102

Bonnet C, Krieger S, Vezain M, Rousselin A, Tournier I, Martins A, Berthet P, Chevrier A, Dugast C, Layet V, Rossi A, Lidereau R, Frébourg T, Hardouin A, Tosi M. Screening BRCA1 and BRCA2 unclassified variants for splicing mutations using reverse transcription PCR on patient RNA and an ex vivo assay based on a splicing reporter minigene. *J Med Genet*. 2008;45:438-446

Borzym-Kluczyk M, Radziejewska I, Zaniewska A, Borzym-Lewszuk A, Szajda SD, Knaś M, Zwierz K, Darewicz B. Effect of smoking on activity of N-acetyl- $\beta$ -hexosaminidase in serum and urine of renal cancer patients. *Clin Biochem*. 2009;42:1565-1567.

Bosch ME, Aldrich A, Fallet R, Odvody J, Burkovetskaya M, Schuberth K, Fitzgerald JA, Foust KD, Kielian T. Self-Complementary AAV9 Gene Delivery Partially Corrects Pathology Associated with Juvenile Neuronal Ceroid Lipofuscinosis (CLN3). *J Neurosci*. 2016;36

Bose SJ, Scott-Ward TS, Cai Z, Sheppard DN. Exploiting species differences to understand the CFTR Cl<sup>-</sup> channel. *Biochem Soc Trans*. 2015;43

Bradbury AM, Peterson TA, Gross AL, Wells SZ, McCurdy VJ, Wolfe KG, Dennis JC, Brunson BL, Gray-Edwards H, Randle AN, Johnson AK, Morrison EE, Cox NR, Baker HJ, Sena-Esteves M, Martin DR. AAV-mediated gene delivery attenuates neuroinflammation in feline Sandhoff disease. *Neuroscience*. 2017;340:117-125

Brooks DJ. Increased Frequency of Cysteine, Tyrosine, and Phenylalanine Residues Since the Last Universal Ancestor. *Mol Cell Proteomics*. 2002;1:125-131

Brown C a., McInnes B, Dodelson de Kremer R, Mahuran DJ. Characterization

- of two HEXB gene mutations in Argentinean patients with Sandhoff disease. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis.* 1992;1180:91-98.
- Buratti E, Baralle M, Baralle FE. Defective splicing, disease and therapy: Searching for master checkpoints in exon definition. *Nucleic Acids Res.* 2006;34:3494-3510.
- Burgel P-R et al. Non-classic cystic fibrosis associated with D1152H CFTR mutation. *Clin Genet.* 2010;77:355-364.
- Casal JA, Cano E, Tutor JC. Beta-Hexosaminidase isoenzyme profiles in serum, plasma, platelets and mononuclear, polymorphonuclear and unfractionated total leukocytes. *Clin Biochem.* 2005;38:938-942.
- Casals T et al. Missense mutation R1066C in the second transmembrane domain of CFTR causes a severe cystic fibrosis phenotype: Study of 19 heterozygous and 2 homozygous patients. *Hum Mutat.* 1997;10:387-392
- Castaños C et al. Guía de diagnóstico y tratamiento de pacientes con fibrosis quística . Actualización. *Consenso Nac Fibras Quística.* 2014;1-65.
- Castellani C, Cuppens H. Consensus on the use and interpretation of cystic fibrosis mutation analysis in clinical practice. *Cyst Fibros.* 2008;7:179-196
- Cazzella V, Martone J, Pinnarò C, Santini T, Twayana SS, Sthandier O, D'Amico A, Ricotti V, Bertini E, Muntoni F, Bozzoni I. Exon 45 Skipping Through U1-snRNA Antisense Molecules Recovers the Dys-nNOS Pathway and Muscle Differentiation in Human DMD Myoblasts. *Mol Ther.* 2012;20:2134-2142.
- Centre Universitaire de Santé McGill at Montréal. HEX Database. 2003
- Chertkoff L, Visich A, Bienvenu T, Grenoville M, Segal E, Carniglia L, Kaplan JC, Barreiro C. Spectrum of CFTR mutations in Argentine cystic fibrosis patients. *Clin Genet.* 1997;51:43-47.
- Chillón M, Casals T, Nunes V, Giménez J, Pérez Ruiz E, Estivill X. Identification of a new missense mutation (P205S) in the first transmembrane domain of

the CFTR gene associated with a mild cystic fibrosis phenotype. *Hum Mol Genet.* 1993;2:1741-1742

Chiricozzi E, Niemir N, Aureli M, Magini A, Loberto N, Prinetti A, Bassi R, Polchi A, Emiliani C, Caillaud C, Sonnino S. Chaperone Therapy for GM2 Gangliosidosis: Effects of Pyrimethamine on  $\beta$ -Hexosaminidase Activity in Sandhoff Fibroblasts. *Mol Neurobiol.* 2014;50:159-167.

Conzelmann E, Kytzia HJ, Navon R, Sandhoff K. Ganglioside GM2 N-acetyl-beta-D-galactosaminidase activity in cultured fibroblasts of late-infantile and adult GM2 gangliosidosis patients and of healthy probands with low hexosaminidase level. *Am J Hum Genet.* 1983;35:900-913.

Cooper TA. Use of minigene systems to dissect alternative splicing elements. *Methods.* 2005;37:331-340

Coutinho MF, Santos JI, Alves S. Less Is More: Substrate Reduction Therapy for Lysosomal Storage Disorders. *Int J Mol Sci.* 2016;17

Cox TM. Innovative Treatments for Lysosomal Diseases. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2015;29:275-311

Cox TM, Cachón-González MB. The cellular pathology of lysosomal diseases. *J Pathol.* 2012;226:241-254.

Cutting GR, Zeitlin PL. Genetics and pathophysiology of cystic fibrosis. En: Disorders of the respiratory tract in children, 8th ed. (Wilmott RW, Bush A, Boat TF, Deterding RR, Ratjen F, Chernick V, eds), pp 753-762. Philadelphia: Elsevier/Saunders.

Cystic Fibrosis Centre at the Hospital for Sick Children in Toronto. Cystic Fibrosis Mutation Database (CFTR1). 2011; Disponible en : [www.genet.sickkids.on.ca/cftr/](http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/).

Delnooz CCS, Lefeber DJ, Langemeijer SMC, Hoffjan S, Dekomien G, Zwarts MJ, Van Engelen BGM, Wevers R a, Schelhaas HJ, van de Warrenburg BPC. New cases of adult-onset Sandhoff disease with a cerebellar or lower motor neuron phenotype. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2010;81:968-972.

- Dequeker E, Stuhmann M, Morris MA, Casals T, Castellani C, Claustres M, Cuppens H, Georges M, Ferec C, Macek M, Pignatti P, Scheffer H, Schwartz M, Witt M. Best practice guidelines for molecular genetic diagnosis of cystic fibrosis and CFTR-related disorders – updated European recommendations. *Eur J Hum Genet.* 2009;17:51-65.
- Der Kaloustian VM, Khoury MJ, Hallal R, Idriss ZH, Deeb ME, Wakid NW, Haddad FS. Sandhoff disease: a prevalent form of infantile GM2 gangliosidosis in Lebanon. *Am J Hum Genet.* 1981;33:85-89.
- Desmet F-O, Hamroun D, Lalonde M, Collod-Beroud G, Claustres M, Beroud C. Human Splicing Finder: an online bioinformatics tool to predict splicing signals. *Nucleic Acids Res.* 2009;37:e67-e67
- Desviat LR, Pérez B, Ugarte M. Minigenes to Confirm Exon Skipping Mutations. En: *Methods in Molecular Biology* (Aartsma-Rus A, ed), pp 37-47.
- Dlott B, D’Azzo A, Quon DVK, Neufeld EF. Two mutations produce intron insertion in mRNA and elongated ??-subunit of human ??-hexosaminidase. *J Biol Chem.* 1990;265:17921-17927.
- Dodelson de Kremer R, Boldini C, Capra A, Levstein I, Bainttein N, Hidalgo P, Hilba H. Sandhoff disease: 36 cases from córdoba, Argentina. *J Inher Metab Dis.* 1985;76:45
- Dodelson de Kremer R, Capra A, Boldini C. Estimation of heterozygote frequency of Sandhoff disease in a high-risk Argentinian population. Predictive assignment of the genotype through statistical analysis. *Med (Buenos Aires).* 1987;47:455-463.
- Dodelson de Kremer R, Molina de Levstein I. Enfermedad de Sandhoff o Gangliosidosis GM2 tipo 2. Alta frecuencia del gen en una población criolla. *Med (Buenos Aires).* 1980;40:55-73.
- Dodelson de Kremer R, Oller de Ramírez AM. La Enfermedad de Sandhoff en el Valle de Traslasierra de Córdoba y en los Llanos de la Rioja, Argentina. Un paradigma de patología genética de alta incidencia regional. En:

Bioquímica Molecular, 1ra ed., pp 447-494. San Luis: Nueva Editorial Universitaria.

Dujardin G, Commandeur D, Le Jossic-Corcos C, Ferec C, Corcos L. Splicing defects in the CFTR gene: Minigene analysis of two mutations, 1811+1G>C and 1898+3A>G. *J Cyst Fibros.* 2011a;10:212-216

Dujardin G, Commandeur D, Le Jossic-Corcos C, Ferec C, Corcos L, Blaustein M, al. et. Splicing defects in the CFTR gene: minigene analysis of two mutations, 1811+1G>C and 1898+3A>G. *J Cyst Fibros.* 2011b;10:212-216

Elborn S, Vallieres E. Cystic fibrosis gene mutations: evaluation and assessment of disease severity. *Adv Genomics Genet.* 2014;161

Essawi O, Farraj M, De Leeneer K, Steyaert W, De Pauw K, De Paepe A, Claes K, Essawi T, Coucke PJ. Next generation sequencing to determine the cystic fibrosis mutation spectrum in Palestinian population. *Dis Markers.* 2015;2015:458653

Fagerberg L et al. Analysis of the human tissue-specific expression by genome-wide integration of transcriptomics and antibody-based proteomics. *Mol Cell Proteomics.* 2014;13:397-406

Fajac I, De Boeck K. New horizons for cystic fibrosis treatment. *Pharmacol Ther.* 2017;170:205-211

Farrell PM. The prevalence of cystic fibrosis in the European Union. *J Cyst Fibros.* 2008;7:450-453

Furihata K, Drousiotou A, Hara Y, Christopoulos G, Stylianidou G, Anastasiadou V, Ueno I, Ioannou P. Novel splice site mutation at IVS8 nt 5 of HEXB responsible for a Greek- Cypriot case of Sandhoff disease. *Hum Mutat.* 1999;13:38-43.

Gaignard P, Fagart J, Niemir N, Puech JP, Azouguene E, Dussau J, Caillaud C. Characterization of seven novel mutations on the HEXB gene in French Sandhoff patients. *Gene.* 2013;512:521-526



- Gibson LE, Cooke RE. A test for concentration of electrolytes in sweat in cystic fibrosis of the pancreas utilizing pilocarpine by iontophoresis. *Pediatrics*. 1959;23:545-549
- Girardet A, Viart V, Plaza S, Daina G, De Rycke M, Des Georges M, Fiorentino F, Harton G, Ishmukhametova A, Navarro J, Raynal C, Renwick P, Saguet F, Schwarz M, SenGupta S, Tzetis M, Roux A-F, Claustres M. The improvement of the best practice guidelines for preimplantation genetic diagnosis of cystic fibrosis: toward an international consensus. *Eur J Hum Genet*. 2015;1-10
- Giuliani R, Antonucci I, Torrente I, Grammatico P, Palka G, Stuppia L. Identification of the second CFTR mutation in patients with congenital bilateral absence of vas deferens undergoing ART protocols. *Asian J Androl*. 2010;12:819-826
- Glaus E, Schmid F, Da Costa R, Berger W, Neidhardt J. Gene therapeutic approach using mutation-adapted U1 snRNA to correct a RPGR splice defect in patient-derived cells. *Mol Ther*. 2011;19:936-941
- Gomez-Brouchet a., Cintas P, Lagier E, Voisin T, Delisle MB, Fabre N, Gérard G, Salvayre R, Levade T. CASE REPORT: Adult Sandhoff disease presenting with chronic diarrhoea. *J Inherit Metab Dis*. 1999;22:187-188.
- Goracznik R, Wall B a, Behlke M a, Lennox K a, Ho ES, Zaphiros NH, Jakubowski C, Patel NR, Zhao S, Magaway C, Subbie S a, Jenny Yu L, Lacava S, Reuhl KR, Chen S, Gunderson SI. U1 Adaptor Oligonucleotides Targeting BCL2 and GRM1 Suppress Growth of Human Melanoma Xenografts In Vivo. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2013;2:e92
- Gort L, De Olano N, Macías-Vidal J, Coll MJ. GM2 gangliosidosis in Spain: Analysis of the HEXA and HEXB genes in 34 Tay-Sachs and 14 Sandhoff patients. *Gene*. 2012;506:25-30
- Gravel RA, Kaback MM, Proia RL, Sandhoff K, Suzuki K, Suzuki K. The GM2 Gangliosidosis. En: *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited*

- Disease, 8th ed. (Scriver C, Beaudet A, Sly W, Valle D, eds), pp 3827–3876. New York: McGraw-Hill.
- Gupta S, Villalón CM. The relevance of preclinical research models for the development of antimigraine drugs: Focus on 5-HT<sub>1B/1D</sub> and CGRP receptors. *Pharmacol Ther.* 2010;128:170-190
- Havens M a., Duelli DM, Hastings ML. Targeting RNA splicing for disease therapy. *Wiley Interdiscip Rev RNA.* 2013;4:247-266.
- Hendriksz CJ, Corry PC, Wraith JE, Besley GTN, Cooper a, Ferrie CD. Juvenile Sandhoff disease--nine new cases and a review of the literature. *J Inherit Metab Dis.* 2004;27:241-249.
- Hepbildikler ST, Sandhoff R, Kölzer M, Proia RL, Sandhoff K. Physiological substrates for human lysosomal  $\beta$ -hexosaminidase S. *J Biol Chem.* 2002;277:2562-2572.
- Highsmith WE, Friedman KJ, Burch LH, Spock A, Silverman LM, Boucher RC, Knowles MR. A CFTR mutation (D1152H) in a family with mild lung disease and normal sweat chlorides. *Clin Genet.* 2005;68:88-90
- Hollak CEM, Weinreb NJ. The attenuated/late onset lysosomal storage disorders: Therapeutic goals and indications for enzyme replacement treatment in Gaucher and Fabry disease. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2015;29:205-218
- Huang Y, Xie T, Zheng J, Zhao X, Liu H, Liu L. [Clinical and molecular characteristics of a child with juvenile Sandhoff disease]. *Zhonghua er ke za zhi = Chinese J Pediatr.* 2014;52:313-316
- Hultberg B, Isaksson A, Berglund M, Moberg A. Serum B-Hexosaminidase Isoenzyme: A Sensitive Marker for Alcohol Abuse. *Alcohol Clin Exp Res.* 1991;15:549-552.
- Ikonne JU, Rattazzi MC, Desnick RJ. Characterization of Hex S, the major residual beta hexosaminidase activity in type O Gm2 gangliosidosis (Sandhoff-Jatzkewitz disease). *Am J Hum Genet.* 1975;27:639-650.

Incitti T, De Angelis FG, Cazzella V, Sthandier O, Pinnarò C, Legnini I, Bozzoni I. Exon skipping and duchenne muscular dystrophy therapy: selection of the most active U1 snRNA antisense able to induce dystrophin exon 51 skipping. *Mol Ther.* 2010;18:1675-1682

Institute of Medical Genetics Cardiff University. The Human Gene Mutation Database (HGMD). 2017; Disponible en : <http://www.hgmd.cf.ac.uk>.

Kaya N, Al-Owain M, Abudheim N, Al-Zahrani J, Colak D, Al-Sayed M, Milanlioglu A, Ozand PT, Alkuraya FS. GM2 gangliosidosis in Saudi Arabia: Multiple mutations and considerations for future carrier screening. *Am J Med Genet Part A.* 2011;155:1281-1284.

Kleiman FE, de Kremer RD, de Ramírez a O, Gravel R a, Argaraña CE. Sandhoff disease in Argentina: high frequency of a splice site mutation in the HEXB gene and correlation between enzyme and DNA-based tests for heterozygote detection. *Hum Genet.* 1994;94:279-282.

Kleiman FE, Oller Ramírez a., Akerman B, De Kremer RD, Gravel R a., Argaraña CE. A frequent TG deletion near the polyadenylation signal of the human HEXB gene: Occurrence of an irregular DNA structure and conserved nucleotide sequence motif in the 3' untranslated region. *Hum Mutat.* 1998;12:320-329.

Kolter T, Sandhoff K. Sphingolipid metabolism diseases. *Biochim Biophys Acta - Biomembr.* 2006;1758:2057-2079

Kreindler JL. Cystic fibrosis: Exploiting its genetic basis in the hunt for new therapies. *Pharmacol Ther.* 2010;152:219-229

Kumar P, Henikoff S, Ng PC. Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nat Protoc.* 2009;4:1073-1081

Kuroki Y, Itoh K, Nadaoka Y, Tanaka T, Sakuraba H. A Novel Missense Mutation (C522Y) Is Present in the  $\beta$ -Hexosaminidase  $\beta$ -Subunit Gene of a Japanese Patient. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995;212:564-571.

- Kytzia HJ, Hinrichs U, Sandhoff K. Diagnosis of infantile and juvenile forms of GM2 gangliosidosis variant 0. residual activities toward natural and different synthetic substrates. *Hum Genet.* 1984;67:414-418.
- Le Guédard-Méreuze S, Vaché C, Molinari N, Vaudaine J, Claustres M, Roux a. F, Tuffery-Giraud S. Sequence contexts that determine the pathogenicity of base substitutions at position +3 of donor splice-sites. *Hum Mutat.* 2009;30:1329-1339.
- Lee H-F, Chi C-S, Tsai C-R. Early cardiac involvement in an infantile Sandhoff disease case with novel mutations. *Brain Dev.* 2017;39:171-176
- Lee JH, Choi JH, Namkung W, Hanrahan JW, Chang J, Song SY, Park SW, Kim DS, Yoon JH, Suh Y, Jang IJ, Nam JH, Kim SJ, Cho MO, Lee JE, Kim KH, Lee MG. A haplotype-based molecular analysis of CFTR mutations associated with respiratory and pancreatic diseases. *Hum Mol Genet.* 2003;12:2321-2332.
- Lek M et al. Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. *Nat Publ Gr.* 2016;536
- Lorca N. Parentescos en argentina. El caso de las sierras de Córdoba. En: *Familias Iberoamericanas. Ayer y Hoy., 2da ed.* (Ghirardi M, ed), pp 151-168. Córdoba. Argentina.: UNFPA, ALAP.
- Lowden J a, Ives EJ, Keene DL, Burton a L, Skomorowski M a, Howard F. Carrier detection in Sandhoff disease. *Am J Hum Genet.* 1978;30:38-45.
- Maegawa GHB, Stockley T, Tropak M, Banwell B, Blaser S, Kok F, Giugliani R, Mahuran D, Clarke JTR. The natural history of juvenile or subacute GM2 gangliosidosis: 21 new cases and literature review of 134 previously reported. *Pediatrics.* 2006;118:e1550-e1562.
- Mahuran DJ. Biochemical consequences of mutations causing the GM2 gangliosidoses. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis.* 1999;1455:105-138.
- Masciullo M, Santoro M, Modoni A, Ricci E, Guitton J, Tonali P, Silvestri G. Substrate reduction therapy with miglustat in chronic GM2 gangliosidosis

- type Sandhoff: results of a 3-year follow-up. *J Inherit Metab Dis.* 2010;1-7.
- Matos L, Canals I, Dridi L, Choi Y, Prata MJ, Jordan P, Desviat LR, Pérez B, Pshezhetsky A V, Grinberg D, Alves S, Vilageliu L. Therapeutic strategies based on modified U1 snRNAs and chaperones for Sanfilippo C splicing mutations. *Orphanet J Rare Dis.* 2014;9:180
- Matsuoka K, Tamura T, Tsuji D, Dohzono Y, Kitakaze K, Ohno K, Saito S, Sakuraba H, Itoh K. Therapeutic potential of intracerebroventricular replacement of modified human  $\beta$ -hexosaminidase B for GM2 gangliosidosis. *Mol Ther.* 2011;19:1017-1024
- Matsuoka K, Tsuji D, Aikawa S-I, Matsuzawa F, Sakuraba H, Itoh K. Introduction of an N-glycan sequon into HEXA enhances human beta-hexosaminidase cellular uptake in a model of Sandhoff disease. *Mol Ther.* 2010;18:1519-1526
- McCurdy VJ, Rockwell HE, Arthur JR, Bradbury AM, Johnson AK, Randle AN, Brunson BL, Hwang M, Gray-Edwards HL, Morrison NE, Johnson JA, Baker HJ, Cox NR, Seyfried TN, Sena-Esteves M, Martin DR. Widespread correction of central nervous system disease after intracranial gene therapy in a feline model of Sandhoff disease. *Gene Ther.* 2015;22:181-189
- Meng X, Clews J, Kargas V, Wang X, Ford RC. The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) and its stability. *Cell Mol Life Sci.* 2017a;74:23-38
- Meng X, Wang Y, Wang X, Wrennall JA, Rimington TL, Li H, Cai Z, Ford RC, Sheppard DN. Two Small Molecules Restore Stability to a Subpopulation of the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator with the Predominant Disease-causing Mutation. *J Biol Chem.* 2017b;292:3706-3719
- Mitsuo K, Nakano T, Kobayashi T, Goto I, Taniike M, Suzuki K. Juvenile Sandhoff disease: a Japanese patient carrying a mutation identical to that found earlier in a Canadian patient. *J Neurol Sci.* 1990;98:277-286.

- Mugnaini J, Pereyra M, Dodelson R, Gamboni B, Argara CE, Ram AMO. Variante juvenil de la enfermedad de Sandhoff: presentación del primer caso descrito en Argentina. Arch Argent Pediatr. 2017;115:298-301.
- Mussaffi H, Prais D, Mei-Zahav M, Blau H. Cystic Fibrosis Mutations with Widely Variable Phenotype: The D1152H Example. Pediatr Pulmonol. 2006;41:250-254
- Nakano T, Suzuki K. Genetic Cause of a Juvenile Form of Sandhoff Disease. J Biol Chem. 1989;264:5155-5158.
- Navon R, Adam A. Thermolabile Hexosaminidase (Hex) B: Diverse Frequencies among Jewish Communities and Implication for screening of sera for Hex A Deficiencies. Hum hered. 1990;40:99-104.
- Neote K, McInnes B, Mahuran DJ, Gravel R a. Structure and distribution of an Alu-type deletion mutation in Sandhoff disease. J Clin Invest. 1990;86:1524-1531.
- Ng PC, Henikoff S. SIFT: Predicting amino acid changes that affect protein function. Nucleic Acids Res. 2003;31:3812-3814
- O'Brien JS, Okada S, Chen A, Fillerup DL. Tay-Sachs Disease: Detection of Heterozygotes and Homozygotes by Serum Hexosaminidase Assay. N Engl J Med. 1970;283:15-20
- O'Dowd BF, Klavins MH, Willard HF, Gravel R, Lowden J a., Mahuran DJ. Molecular heterogeneity in the infantile and juvenile forms of Sandhoff disease (O-variant G(M2) gangliosidosis). J Biol Chem. 1986;261:12680-12685.
- Oller Ramírez AM. Investigación de heterocigotas de la Gangliosidosis GM2, tipo II (Enfermedad de Sandhoff). Definición genotípica y caracterización bioquímica de las isoenzimas del sistema de beta hexosaminidasa. TESIS DOCTORAL. 1996;
- Oller Ramírez AM, Ghio A, Melano M, Dodelson R. Fibrosis quística: diagnóstico molecular en 93 pacientes argentinos y detección familiar de

portadores . Impacto asistencial y proyección a nuevos avances terapéuticos. Arch Argent Pediatr. 2008;106:310-319.

Oller Ramírez AM, Ramos MD, Jiménez J, Ghio A, De Botelli MM, Rezzónico C a., Marqués I, Pereyro S, Casals T, De Kremer RD. Mutational spectrum of cystic fibrosis patients from Córdoba province and its zone of influence: Implications of molecular diagnosis in Argentina. Mol Genet Metab. 2006;87:370-375.

Osmon KJL, Woodley E, Thompson P, Ong K, Karumuthil-Meilethil S, Keimel JG, Mark BL, Gray SJ, Walia JS. Systemic Gene Transfer of a Hexosaminidase Variant Using an scAAV9.47 Vector Corrects G M2 Gangliosidosis in Sandhoff Mice. Hum Gene Ther. 2016;27:497-508

Pagani F, Baralle FE. Analysis of Human Splicing Defects Using Hybrid Minigenes 11.1 Introduction. En: Molecular Diagnostics, 2nd ed. (Patrinos GP, Ansorge WJ, eds), pp 155-169. Elsevier.

Pagani F, Buratti E, Stuani C, Bendix R, Dörk T, Baralle FE. A new type of mutation causes a splicing defect in ATM. Nat Genet. 2002;30:426-429

Pagani F, Stuani C, Tzetis M, Kanavakis E, Efthymiadou A, Doudounakis S, Casals T, Baralle FE. New type of disease causing mutations: The example of the composite exonic regulatory elements of splicing in CFTR exon 12. Hum Mol Genet. 2003;12:1111-1120.

Pagon, RA Adam MBT. Hexosaminidase A deficiency. GenReviews. 2011;1-13.

Palma AG, Kotsias BA, Marino GI. Funciones de los canales iónicos CFTR y ENAC en la fibrosis quística. Med (Buenos Aires). 2014;74:133-139

Parenti G, Andria G, Ballabio A. Lysosomal Storage Diseases: From Pathophysiology to Therapy. Annu Rev Med. 2015a;66:471-486

Parenti G, Andria G, Valenzano KJ, Kim S, Kottwitz J, Morant A, al. et. Pharmacological Chaperone Therapy: Preclinical Development, Clinical Translation, and Prospects for the Treatment of Lysosomal Storage Disorders. Mol Ther. 2015b;23:1138-1148

- Pepermans X, Mellado S, Chialina S, Wagener M, Gallardo L, Lande H, Bordino W, Baran D, Bours V, Leal T. Identification and frequencies of cystic fibrosis mutations in central Argentina. *Clin Biochem.* 2016;49:154-160
- Pérez MM, Luna MC, Pivetta OH, Keyeux G. CFTR gene analysis in Latin American CF patients: Heterogeneous origin and distribution of mutations across the continent. *J Cyst Fibros.* 2007;6:194-208.
- Pierson TM, Torres P a., Zeng B-J, Glanzman AM, Adams D, Finkel RS, Mahuran DJ, Pastores GM, Tennekoon GI, Kolodny EH. Juvenile-onset motor neuron disease caused by novel mutations in  $\beta$ -hexosaminidase. *Mol Genet Metab.* 2012;108:65-69
- Pignatti PF, Bombieri C, Marigo C, Benetazzo M, Luisetti M. Increased incidence of cystic fibrosis gene mutations in adults with disseminated bronchiectasis. *Hum Mol Genet.* 1995;4:635-639.
- Pinotti M, Balestra D, Rizzotto L, Maestri I, Pagani F, Bernardi F. Rescue of coagulation factor VII function by the U1+5A snRNA. *Blood.* 2009;113:6461-6464.
- Pinotti M, Rizzotto L, Balestra D, Lewandowska MA, Cavallari N, Marchetti G, Bernardi F, Pagani F. U1-snRNA mediated rescue of mRNA processing in severe factor VII deficiency. *Blood.* 2008;111:2681-2684.
- Polizzi A, Tesse R, Santostasi T, Diana A, Manca A, Logrillo VP, Cazzato MD, Pantaleo MG, Armenio L. Genotype-phenotype correlation in cystic fibrosis patients bearing [H939R;H949L] allele. *Genet Mol Biol.* 2011;34:416-420
- Radpour R, Gourabi H, Dizaj A V., Holzgreve W, Zhong XY. Genetic Investigations of CFTR Mutations in Congenital Absence of Vas Deferens, Uterus, and Vagina as a Cause of Infertility. *J Androl.* 2008;29:506-513
- Ramensky V, Bork P, Sunyaev S. Human non-synonymous SNPs: server and survey. *Nucleic Acids Res.* 2002;30:3894-3900
- Repetto GL, lay-son GR, Vásquez maRcos D, puGa alonso, manque patRicio, Repetto G. Artículo originAl ReseaRch RepoRt Secuenciación del



gen CFTR en un grupo de pacientes chilenos con fibrosis quística. Rev chil pediatr. 2014;85:448-454

Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, Grody WW, Hegde M, Lyon E, Spector E, Voelkerding K, Rehm HL. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. Genet Med. 2015;17:405-424

Robert M-A, Gilbert R, Gaillet B. Antibody Delivery Mediated by Recombinant Adeno-associated Virus for the Treatment of Various Chronic and Infectious Diseases. Curr Gene Ther. 2017;16:363-374

Rowe SM, Miller S, Sorscher EJ. Cystic Fibrosis. N Engl J Med. 2005;352:1992-2001

Russell DW, Grompe M. Adeno-associated virus finds its disease. Nat Genet. 2015;47:1104-1105

Sakuraba H, Matsuzawa F, Aikawa S, Doi H, Kotani M, Lin H, Ohno K, Tanaka A, Yamada H, Uyama E. Molecular and structural studies of the GM2 gangliosidosis 0 variant. J Hum Genet. 2002;47:176-183.

Salcedo Posadas A, Giron Moreno R, Beltrán Bengochea B, Sequeiros Gonzáles A. Manifestaciones respiratorias de la fibrosis quística. En: Tratado de Neumología Infantil, 1ra ed. (Cobos Barroso N, González Pérez-Yarza E, eds), pp 683-704. Madrid: Ergon.

Sánchez-Alcudia R, Pérez B, Pérez-Cerdá C, Ugarte M, Desviat LR. Overexpression of adapted U1snRNA in patients' cells to correct a 5' splice site mutation in propionic acidemia. Mol Genet Metab. 2011;102:134-138

Sandhoff K, Harzer K. Gangliosides and Gangliosidoses: Principles of Molecular and Metabolic Pathogenesis. J Neurosci. 2013;33:10195-10208

Santos-Lozano A, Villamandos García D, Sanchis-Gomar F, Fiuza-Luces C, Pareja-Galeano H, Garatachea N, Nogales Gadea G, Lucia A. Niemann-

- Pick disease treatment: a systematic review of clinical trials. *Ann Transl Med.* 2015;3:360
- Schmid F, Glaus E, Barthelmes D, Fliegau M, Gaspar H, Nürnberg G, Nürnberg P, Omran H, Berger W, Neidhardt J. U1 snRNA-mediated gene therapeutic correction of splice defects caused by an exceptionally mild BBS mutation. *Hum Mutat.* 2011;32:815-824.
- Schmidt BZ, Haaf JB, Leal T, Noel S. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator modulators in cystic fibrosis: current perspectives. *Clin Pharmacol.* 2016;8:127-140
- Schneider E, Reyes-Ortega F, Li J, Velkov T. Can Cystic Fibrosis Patients Finally Catch a Breath With Lumacaftor/Ivacaftor? *Clin Pharmacol Ther.* 2017;101:130-141
- Schnorf H, Gitzelmann R, Bosshard NU, Spycher M, Waespe W. Early and severe sensory loss in three adult siblings with hexosaminidase A and B deficiency (Sandhoff disease). *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1995;59:520-523.
- Schwarz M, Gardner A, Jenkins L, Norbury G, Renwick P, Robinson D. Testing Guidelines for molecular diagnosis of Cystic Fibrosis . *Pancreas.* 2009;1.
- Sheppard DN, Travis SM, Ishihara H, Welsh MJ. Contribution of proline residues in the membrane-spanning domains of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator to chloride channel function. *J Biol Chem.* 1996;271:14995-15001
- Sheppard DN, Welsh MJ. Structure and function of the CFTR chloride channel. *Physiol Rev.* 1999;79:S23-S45.
- Srivastava S, Awasthi Y, Yoshida A, Beutler E. Studies on Human Beta-D-N-Acetylhexosaminidases. *J Biol Chem.* 1974;249:2043-2048.
- Steiner B et al. Common CFTR haplotypes and susceptibility to chronic pancreatitis and congenital bilateral absence of the vas deferens. *Hum Mutat.* 2011;32:912-920.

- Susani L, Pangrazio A, Sobacchi C, Taranta A, Mortier G, Savarirayan R, Villa A, Orchard P, Vezzoni P, Albertini A, Frattini A, Pagani F. TCIRG1-dependent recessive osteopetrosis: Mutation analysis, functional identification of the splicing defects, and in vitro rescue by U1 snRNA. *Hum Mutat.* 2004;24:225-235.
- Tamhankar PM, Mistri M, Kondurkar P, Sanghavi D, Sheth J. Clinical, biochemical and mutation profile in Indian patients with Sandhoff disease. *J Hum Genet.* 2016;61:163-166
- Terlizzi V, Carnovale V, Castaldo G, Castellani C, Cirilli N, Colombo C, Corti F, Cresta F, D'Adda A, Lucarelli M, Lucidi V, Macchiaroli A, Madarena E, Padoan R, Quattrucci S, Salvatore D, Zarrilli F, Raia V. Clinical expression of patients with the D1152H CFTR mutation. *J Cyst Fibros.* 2015;14:447-452
- The 1000 Genomes Project Consortium. A global reference for human genetic variation. *Nature.* 2015;526:68-74
- The European Cystic Fibrosis Society. The European Cystic Fibrosis Society Web Page. 2016;
- Tizziano E, Gartner S. Genética y fisiopatología de la fibrosis quística. En: *Tratado de Neumología Infantil*, 1ra ed. (Cobos Barroso N, González Pérez-Yarza E, eds), pp 657-671. Madrid: Ergon.
- Tormo Carciné R, Infante Pina D, Cañadell Gussinyé M. Manifestaciones extrapulmonares de la fibrosis quística. En: *Tratado de Neumología Infantil*, 1ra ed. (Cobos Barroso N, González Pérez-Yarza E, eds), pp 705-716. Madrid: Ergon.
- Tropak MB, Reid SP, Guiral M, Withers SG, Mahuran D. Pharmacological Enhancement of  $\alpha$ -Hexosaminidase Activity in Fibroblasts from Adult Tay-Sachs and Sandhoff Patients. *J Biol Chem.* 2004;279:13478-13487.
- Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, Rozen SG. Primer3--new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res.*

2012;40:e115-e115

US CF Foundation Johns Hopkins University. The Clinical and Functional Translation of CFTR (CFTR2). 2011; Disponible en : <https://www.cftr2.org/>.

Utsumi K, Tsujii a, Kase R, Tanaka a, Tanaka T, Uyama E, Ozawa T, Sakuraba H, Komaba Y, Kawabe M, Iino Y, Katayama Y. Western blotting analysis of the beta-hexosaminidase alpha- and beta-subunits in cultured fibroblasts from cases of various forms of GM2 gangliosidosis. *Acta Neurol Scand.* 2002;105:427-430.

van der Klift HM, Jansen AML, van der Steenstraten N, Bik EC, Tops CMJ, Devilee P, Wijnen JT. Splicing analysis for exonic and intronic mismatch repair gene variants associated with Lynch syndrome confirms high concordance between minigene assays and patient RNA analyses. *Mol Genet Genomic Med.* 2015;3:327-345

van der Woerd WL, Mulder J, Pagani F, Beuers U, Houwen RHJ, van de Graaf SFJ. Analysis of aberrant pre-messenger RNA splicing resulting from mutations in *ATP8B1* and efficient *in vitro* rescue by adapted U1 small nuclear RNA. *Hepatology.* 2015;61:1382-1391

Veit G, Avramescu RG, Chiang AN, Houck SA, Cai Z, Peters KW, Hong JS, Pollard HB, Guggino WB, Balch WE, Skach WR, Cutting GR, Frizzell RA, Sheppard DN, Cyr DM, Sorscher EJ, Brodsky JL, Lukacs GL. From CFTR biology toward combinatorial pharmacotherapy: expanded classification of cystic fibrosis mutations. *Mol Biol Cell.* 2016;27:424-433

Villamizar-Schiller IT, Pabón LA, Hufnagel SB, Serrano NC, Karl G, Jefferies JL, Hopkin RJ, Prada CE. Neurological and cardiac responses after treatment with miglustat and a ketogenic diet in a patient with Sandhoff disease. *Eur J Med Genet.* 2015;58:180-183

Visich A, Zielenski J, Castaños C, Diez G, Grenoville M, Segal E, Barreiro C, Tsui L-C, Chertkoff L. Complete screening of the CFTR gene in Argentine

- cystic fibrosis patients. *Clin Genet.* 2002;61:207-213
- Wakamatsu N, Kobayashi H, Miyatake T, Tsuji S. A novel exon mutation in the human beta-hexosaminidase beta subunit gene affects 3' splice site selection. *J Biol Chem.* 1992;267:2406-2413.
- Walia JS, Altaleb N, Bello A, Kruck C, LaFave MC, Varshney GK, Burgess SM, Chowdhury B, Hurlbut D, Hemming R, Kobinger GP, Triggs-Raine B. Long-Term Correction of Sandhoff Disease Following Intravenous Delivery of rAAV9 to Mouse Neonates. 2015;
- Walker DK. The use of pharmacokinetic and pharmacodynamic data in the assessment of drug safety in early drug development. *Br J Clin Pharmacol.* 2004;58:601-608
- Wallis C. Diagnosis and presentation of cystic fibrosis. En: *Developmental Medicine and Child Neurology*, 8th ed. (Wilmott RW, Bush A, Boat TF, Deterding RR, Ratjen F, Chernick V, eds), pp 763-769. Philadelphia: Elsevier/Saunders.
- Waszkiewicz N, Szajda SD, Jankowska A, Keopka A, Dobryniewski J, Szulc A, Zwierz K. The effect of the binge drinking session on the activity of salivary, serum and urinary  $\beta$ -hexosaminidase: Preliminary data. *Alcohol Alcohol.* 2008;43:446-450.
- Welsh M, Ramsey BW, Accurso F, Cutting G. Cystic fibrosis. En: *The metabolic and molecular bases of inherited disease.*, 8th ed. (Scriver C, Beaudet A, Sly W, Valle D, eds), pp 5121–5188. New York: McGraw-Hill.
- Wilkens S. Structure and mechanism of ABC transporters. *F1000Prime Rep.* 2015;7:14
- Ye L, Yu H, Li C, Hirsch ML, Zhang L, Samulski RJ, Li W, Liu Z. Adeno-Associated Virus Vector Mediated Delivery of the HBV Genome Induces Chronic Hepatitis B Virus Infection and Liver Fibrosis in Mice. *PLoS One.* 2015;10:e0130052
- Yoshimura K, Wakazono Y, Iizuka S, Morokawa N, Tada H, Eto Y. A Japanese

patient homozygous for the H1085R mutation in the CFTR gene presents with a severe form of cystic fibrosis. *Clin Genet.* 1999;56:173-175

Zampieri S, Cattarossi S, Ramírez AM, Rosano C, Lourenco CM, Passon N, Moroni I, Uziel G, Pettinari A, Stanzial F, de Kremer RD, Azar NB, Hazan F, Filocamo M, Bembi B, Dardis A. Sequence and copy number analyses of HEXB gene in patients affected by sandhoff disease: Functional characterization of 9 novel sequence variants. *PLoS One.* 2012;7:1-10.

Zimran A, Wajnrajch M, Hernandez B, Pastores GM. Taliglucerase alfa: safety and efficacy across 6 clinical studies in children and adults with Gaucher disease. *Mol Genet Metab.* 2017;120:S144

Zwierz K, Zalewska a, W Z-Z. Isoenzymes Hex. *Acta Biochim Pol.* 1999;46:739-751.

## **7 ANEXO – Publicación en Archivos Argentina de Pediatría 2017**

Mugnaini J, Pereyra M, Dodelson de Kremer R, Gamboni B, Argaraña CE, Oller Ramírez AM. Variante juvenil de la enfermedad de Sandhoff: presentación del primer caso descrito en Argentina. *Archivos Argentinos de Pediatría* (2017), Vol 115, N 5, pp e298-e301.