



FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUIMICA

TESIS DE MAESTRIA EN BIOLOGIA MOLECULAR MEDICA

**BASES MOLECULARES DE LA DEFICIENCIA DE FOSFORILASA
B QUINASA HEPÁTICA LIGADA AL CROMOSOMA X (GEN
PHKA2) EN PACIENTES ARGENTINOS**

Bioq. Ana Leila Castillo

Directora: Dra. Celia Juana Angaroni

Co-Directora: Dra. Raquel Dodelson de Kremer

Lugar de Trabajo

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

2016

Agradecimientos

En primer lugar quiero agradecer a mi familia, mi esposo y mis hijos por su apoyo incondicional, por completarme cada día y ser mi gran orgullo. A mis padres y colegas, por enseñarme a amar la profesión bioquímica, por creer en mí, por ser mi ejemplo de esfuerzo, constancia y progreso, por permitirme estudiar y apoyarme cada día, Uds. están en mi corazón todos los días. A mis hermanos y sus familias por estar siempre presentes, alegrándose de mis logros y sosteniéndome en los momentos difíciles. A mi prima Noelia que tantas veces me ha dado energía y empuje para lograr los objetivos propuestos. A mi suegra y mi cuñada por su inmenso soporte personal, permitiéndome avanzar en mis proyectos profesionales. Sin ellos nada de esto hubiese sido posible.

A la Dra. Raquel Dodelson de Kremer, por abrirme las puertas de CEMECO, por permitir formarme y crecer en tan prestigiosa institución, por empaparame de innumerables conocimientos por su vasta experiencia y años de estudio. Es un honor para mí haberla conocido, trabajar junto a ella como así también aprender de su perseverancia y esfuerzo en cada momento.

A la Dra. Celia Angaroni, por darme la oportunidad de incursionar en la investigación clínica de las metabolopatías. Por dejarme intentar, aprender, discutir y por transmitirme la pasión por la genética desde la carrera de grado. Por abrirme las puertas a formar parte de la cátedra de Genética bioquímica de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Católica de Córdoba.

Al Dr. Carlos Argaraña y al Dr. Darío Sastre, por su apoyo, su predisposición y su generosidad.

A la Dra. Cynthia Amorosi, por su apoyo incondicional, por sus consejos, su paciencia y su cariño desinteresado, por todos los momentos compartidos, tanto en el ámbito laboral como personal, por estar siempre presente y alegrarse con cada paso que fui dando. A Nydia, Julia, Lorena, Beatriz y Silene por su compañerismo y amistad logrando que en momentos difíciles todo pareciera más simple.

A todos mis compañeros de trabajo en CEMECO, por todo lo compartido durante tantos años, por integrarme y hacerme sentir una más.

Agradezco a todo el equipo de Laboratorio Castillo Chidiak por el apoyo, los consejos, el esfuerzo, dedicación y mucho trabajo que me ha permitido enfocarme en mi trabajo de Tesis de maestría.

A mis compañeros de la Maestría en Biología Molecular Médica que siempre me han compartido sus experiencias y consejos, que me han permitido completar mis conocimientos, en especial a Sofía Tedesco.

A mis amigas incondicionales, siempre alegrándose conmigo de cada logro, y alentándome en los fracasos.

¡¡Muchas gracias!!

A mi esposo Fernando y mis hijos Felipe y Camila

A mis hermanos Patricia y Guillermo

A la memoria de mis padres Guillermo y Emilia

INDICE GENERAL

RESUMEN.....	I
ABSTRACT.....	III
ABREVIATURAS.....	IV
1-INTRODUCCIÓN.....	1
Alteraciones genéticas del metabolismo del glucógeno	1
Enfermedades de Atesoramiento de Glucógeno Hepáticas Diferenciación clínica	3
Defectos en el sistema de la fosforilasa hepática	5
2-OBJETIVOS.....	12
3-MATERIALES Y METODOS.....	13
Serie Patológica	13
Serie control normal: estandarización metodológica	16
Análisis Molecular de la EAG tipo IX ligada al cromosoma X	16
Análisis Molecular de la Glucogenosis tipo VI	21
Análisis Bioinformático	23
Algoritmo para la investigación de los defectos del sistema de la fosforilasa hepática	25
4-RESULTADOS	26
EAG-IX ligada al cromosoma X. Gen PHKA2	27
EAG-VI. Gen PYGL	31
5- DISCUSION Y CONCLUSION.....	37
Diagnóstico de la EAG-IXa (ligada al cromosoma X)	38
Diagnóstico de la EAG-VI	39

RESUMEN

La Enfermedad de Atesoramiento del Glucógeno tipo IX (EAG-IX) es causada por un defecto genético en una de las subunidades de la *fosforilasa-b-quinasa (PHK)* codificadas por los genes PHKA2, PHKB y PHKG2. La deficiencia de *PHK* ligada al cromosoma X (EAG-IXa), gen involucrado PHKA2, presenta dos variantes enzimáticas XLG1 (disminuida en hígado y eritrocitos) y XLG2 (sólo disminuida en hígado). Las deficiencias de *PHK* y *fosforilasa hepáticas*, conforman los Defectos del Sistema de la Fosforilasa (DSF), conduciendo a las denominadas EAG-IX y EAG-VI, respectivamente. La *fosforilasa hepática* es codificada por el gen PYGL. En el presente trabajo, inicialmente, se planteó la estandarización del diagnóstico molecular de la EAG-IX ligada al cromosoma X (gen PHKA2), sin embargo teniendo en cuenta los aspectos clínicos y bioquímicos de las EAG-IXa y EAG-VI, indistinguibles en la primera infancia, se extendió nuestro estudio al gen PYGL. Este trabajo propone definir nosológicamente los DSF mediante la consideración del sexo del paciente, actividad *PHK* en eritrocitos y análisis molecular del gen PHKA2 y gen PYGL. Se estudiaron 2 varones y 3 mujeres de 4 familias no emparentadas. La actividad *PHK* en eritrocitos de los individuos disponibles, resultó deficiente en 1 de los 2 pacientes varones, valores normales en 2 de las 3 probandos de sexo femenino y no se efectuó el ensayo enzimático en los 2 pacientes restantes (hermanos mellizos de diferente género). Se diseñó un algoritmo para el estudio de los genes involucrados en los DSF teniendo en cuenta género de los pacientes y actividad *PHK* eritrocitaria. El estudio del gen PHKA2 en 1 de los pacientes de sexo masculino definió su condición de hemicígota mutado encontrándose un cambio en el sitio aceptor de “splicing” en posición -1 del intrón 10 (c.1042-1G>A) llegando al diagnóstico definitivo EAG-IX ligada al cromosoma X con variante XLG1. El análisis del gen PYGL, identificó cuatro

sustituciones y un polimorfismo: p.Gly233Ser, p.Gly686Arg, p.Met1Lys, p.Glu673Lys y IVS15-2delA, respectivamente. La frecuencia alélica de todas las variaciones génicas detectadas en el gen PYGL resultó del 50% para p.Gly686Arg que estuvo presente en 3 de los 6 alelos estudiados y del 16,6% para los restantes cambios encontrados en este gen en los pacientes investigados en nuestro centro. Se estima que esta investigación es el inicio en un área del conocimiento previamente no abordado en nuestro país que permitió definir pacientes con EAG IX y EAG VI demostrando que el análisis genético representa un procedimiento útil para establecer un diagnóstico certero.

ABSTRACT

The Glycogen Storage Disease type IX (GSD-IX) is caused by a genetic defect in one of the hepatic PHK subunits encoded by PHKA2, PHKG2 and PHKB genes, respectively. The PHK deficiency linked to the X chromosome (PHKA2 gene) presents two enzymatic variants: XLG1 (reduced in liver and erythrocytes) and XLG2 (only decreased in liver). The phosphorylase-b kinase (PHK) and phosphorylase deficiencies in the liver constitute the phosphorylase system defects (PSD), leading to Glycogen Storage Disease Type IX (GSD-IX) and Type VI (GSD-VI), respectively. The hepatic phosphorylase is encoded by PYGL gene. Both types of GSD (VI and IX) are clinical and biochemical similar in early childhood. The aim of this work is to define nosologically PSD, taking into account the gender of the patient, PHK activity in erythrocytes, and molecular analysis of the PHKA2 gene and PYGL gene. 2 men and 3 women of 4 unrelated families were studied. PHK activity in erythrocytes was analysed in 1 of the male patients that resulted deficient, and was normal in two of the female probands. The molecular analysis of the PHKA2 gene, in 1 of the male patients, identified a mutation in intron 10 (c.1042-1G>A). On the other hand, the molecular analysis of the PYGL gene identified three novel missense mutations, p.Gly233Ser and p.Gly686Arg, p.Met1Lys, one already described missense mutation p.Glu673Lys and the IVS15-2delA polymorphism. The allele frequency of P.Gly686Arg was 50%. The in silico studies predict that new mutations would affect the enzyme functionality. This study allowed the accurate diagnosis of GSD-IX and GSD-VI. This research represents a continuity of the Project for the exact definition of PSD, unprecedented area of knowledge in our country.

ABREVIATURAS

A: Adenina

AA: Aminoácidos

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADNc: ADN copia

ADP: Adenosina Di Fosfato

ARN: Ácido Ribonucleico

ARNm: Ácido Ribonucleico Mensajero

ATP: Adenosina Tri Fosfato

C: Citosina

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

dATP: Desoxiadenosin Trifosfato

dCTP: Desoxicitosina Trifosfato

dGTP: Desoxiguanosin Trifosfato

dTTP: Desoxitimidina Trifosfato

dNTPs: Desoxiribonucleotidos Trifosfato

EAGs: Enfermedades de Atesoramiento del Glucógeno

EDTA: Ácido Etilendiaminotetraacético

G: Guanina

G1P: Glucosa 1-fosfato

G6P: Glucosa-6-fosfato

INTA: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria

ME: MaxEntScan

NN: Neural Network

PBS: Tampón Fosfato Salino

PHK: Fosforilasa b Quinasa

PKA: Proteína Quinasa A

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa reversa

SDS: Dodecil Sulfato de Sodio

SIFT: Sorting Intolerant From Tolerant

SNP: Polimorfismo de Nucleótido Simple

T: Timina

XGL1: Glucogenosis Ligada al cromosoma X tipo 1

XGL2: Glucogenosis Ligada al cromosoma X tipo 2

I- Alteraciones genéticas del metabolismo del glucógeno

Las Enfermedades de Almacenamiento de Glucógeno (EAGs) o Glucogenosis comprenden un grupo de entidades clínicas que se caracterizan por el almacenamiento de una concentración y/o estructura anormal de glucógeno ¹. Cada una de ellas se origina por una deficiencia enzimática específica relacionada con la vía de síntesis o degradación de esta macromolécula, o bien con la regulación de su metabolismo (Tabla D).

El hígado y el músculo tienen gran cantidad de glucógeno y son los tejidos más común y seriamente afectados. Debido a que el metabolismo de los hidratos de carbono en el hígado es responsable de la homeostasis de la glucosa plasmática, las EAGs que afectan principalmente al hígado, ***glucogenosis hepáticas***, cursan con hepatomegalia e hipoglucemia como principales signos característicos, generalmente sin esplenomegalia o colestasis. Asimismo, los pacientes presentan con frecuencia hiperlipidemia, hiperláticoacidemia, hiperuricemia, hipoinsulinismo y retardo en el crecimiento. La clasificación nosológica actual de las EAGs hepáticas consiste en las siguientes deficiencias enzimáticas: *glucosa-6-fosfatasa* (EAG-Ia), *glucosa-6-fosfato translocasa* (EAG-Ib), *amilo 1,6-glucosidasa* (enzima desramificante; EAG-III), *fosforilasa hepática* (EAG-VI) y *fosforilasa b quinasa* (EAG-IXa-c), todas ellas pertenecientes al grupo de las alteraciones en el catabolismo del glucógeno ². Los defectos de la *glucógeno sintasa* (EAG-0a) y la *amilo 1,4-1,6 transglucosidasa* (enzima ramificante; EAG-IV) son alteraciones en la síntesis del glucógeno, y corresponden también al grupo de las EAGs hepáticas ^{1,2}.

En el músculo, el rol del glucógeno es proveer sustratos que permitan la generación de ATP necesario para la contracción muscular. Así, ***glucogenosis musculares*** son aquellas que afectan principalmente al músculo y se caracterizan por

Tabla I. Alteraciones genéticas en el metabolismo del glucógeno

Nombre de la Enfermedad (MIM) ^a	Proteína deficiente	Gen	Tejidos afectados	Epónimos/Sinónimos
EAG-0a (240600)	<i>glucógeno sintasa hepática</i>	<i>GYS2</i>	Hígado	Deficiencia de glucógeno sintasa hepática
EAG-0b (611556)	<i>glucógeno sintasa muscular</i>	<i>GYS1</i>	Musculo	Deficiencia de glucógeno sintasa muscular
EAG-Ia (232200)	<i>glucosa-6-fosfatasa</i>	<i>G6PC</i>	Hígado, riñón e intestino	Deficiencia de Glucosa-6-fosfatasa
EAG-I no-a (232220)	<i>glucosa-6-fosfato translocasa</i>	<i>G6PT1 (SLC37A4)</i>	Hígado, riñón, intestino y neutrófilos	Deficiencia de Glucosa-6-fosfato translocasa
EAG-IIa (232300)	<i>α 1,4 glucosidasa</i>	<i>GAA</i>	Todos los órganos	Deficiencia de alfa 1,4-glucosidasa lisosomal
EAG-IIb (300257)	<i>Proteína 2 de membrana asociada al lisosoma</i>	<i>LAMP2</i>	Todos los órganos	Deficiencia de LAMP2
EAG- III (232400)	<i>Amilo-1,6-glucosidasa (enzima desramificante)</i>	<i>AGL</i>	Hígado, músculo y corazón	Deficiencia Amilo 1,6 glucosidasa
EAG- IV (232500)	<i>oligo-1,4-1,6-glucano transferasa (enzima ramificante)</i>	<i>GBE1</i>	Glucógeno anormal generalizado	Deficiencia de la enzima ramificante de glucógeno
EAG-V (232600)	<i>fosforilasa muscular</i>	<i>PYGM</i>	Músculo	Deficiencia de Fosforilasa muscular
EAG- VI (232700)	<i>fosforilasa hepática</i>	<i>PYGL</i>	Hígado	Deficiencia de fosforilasa hepática
EAG- VII (232800)	<i>fosfofructoquinasa 1 muscular</i>	<i>PFKM</i>	Músculo esquelético, hematíes	Deficiencia de Fosfofructoquinasa muscular
EAG- IXa-c (306000) (261750) (613027)	<i>Fosforilasa b quinasa hepática</i>	<i>PHKA2/PHKB/PHKG2</i>	Hígado, músculo	Deficiencia de Fosforilasa quinasa hepática
EAG- IXd (300559)	<i>Fosforilasa b quinasa muscular</i>	<i>PHKA1</i>	Musculo	Deficiencia de Fosforilasa quinasa muscular
EAG- X (261670)	<i>Fosfoglicerato mutasa</i>	<i>PGAM2</i>	Musculo	Deficiencia de Fosfoglicerato mutasa muscular
EAG- XI (612933)	<i>Lactato deshidrogenasa A</i>	<i>LDHA-D</i>	Musculo	Deficiencia de Lactato deshidrogenasa A
EAG- XII (611881)	<i>Aldolasa A</i>	<i>ALDOA</i>	Musculo	Deficiencia de Aldolasa A
EAG- XIII (612932)	<i>Beta enolasa</i>	<i>ENO3</i>	Musculo	Deficiencia de Beta enolasa
EAG- XIV	<i>Fosfoglucomutasa</i>	<i>PGM1</i>	Musculo	Deficiencia de la Fosfoglucomutasa
EAG-XV (613507)	<i>Glucogenina 1</i>	<i>GYG1</i>	Musculo y corazón	Deficiencia de Glucogenina 1

^aMIM: número del desorden genético según la base de datos Mendelian Inheritance on Man.

(³Sandubray, 2012) (²Santer R, 2014)

dolor muscular, intolerancia al ejercicio (fatigabilidad manifiesta) y mioglobinuria. Este grupo incluye la deficiencia de *fosforilasa muscular* (EAG-V) y las deficiencias de *fosfofructoquinasa* (EAG-VII), *fosforilasa b quinasa muscular* (EAG-IXd), *fosfoglicerato mutasa* (EAG-X), *lactato deshidrogenasa* (EAG-XI), *fructosa 1,6-bifosfato aldolasa A* (EAG-XII), *beta enolasa* (EAG-XIII), *Fosfoglucomutasa* (EAG-XIV), *Glucogenina 1* (EAG-XV) y *glucógeno sintasa muscular* (EAG-0b)¹⁻³.

Por último cabe mencionar las **glucogenosis sistémicas**, ocasionadas por las deficiencias en la α -*glucosidasa ácida* o *Maltasa ácida* (EAG-IIa) y en la proteína 2 de la membrana asociada al lisosoma (EAG-IIb), que producen acumulación lisosomal de un glucógeno de estructura anormal en numerosos tejidos, principalmente en músculo cardíaco, esquelético y en el tejido hepático de los pacientes afectados ¹.

En la Tabla I se detallan los diferentes tipos de EAGs, las enzimas deficientes que las producen, los genes involucrados, los tejidos afectados como así también su denominación alternativa ².

II- Enfermedades de Atesoramiento de Glucógeno Hepáticas Diferenciación clínica

En la Fig. 1 se encuentran representadas las EAG que afectan al hígado tanto en la vía de degradación del glucógeno (EAG-I, EAG-III, EAG-VI y EAG-IX) como en la de su síntesis (EAG-0 y EAG-IV). Así podemos observar en la vía catabólica del Glucógeno actúa primero la Fosforilasa quinasa que pasa de su forma inactiva a su forma activa para pasar la Fosforilasa b (inactiva) a fosforilasa a (activa). Esta enzima fosforilasa en el hígado actúa sobre el Glucógeno y junto con la enzima desramificante pasa a Glucosa 1-fosfato (G1P), la cual es convertida en glucosa-6-fosfato (G6P) por medio de la catálisis llevada a cabo por la enzima fosfoglucomutasa. Esta G6P es la que ingresa al retículo endoplásmico y por el sistema de la Glucosa-6-fosfatasa se convierte en glucosa que es la que utiliza el organismo para la homeostasis celular. Respecto a la

vía de síntesis, en los hepatocitos a partir de la G1P por la Glucógeno sintetasa y posteriormente por la enzima ramificante se almacena la macromolécula del Glucógeno.

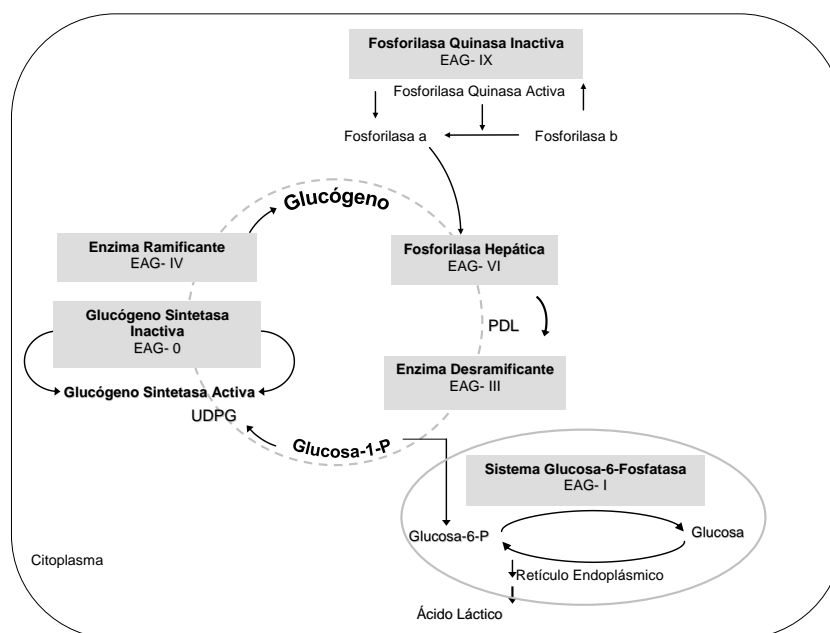


Figura 1. Representación esquemática del metabolismo del Glucógeno en hígado. Cada Tipo de EAG hepática se especifica debajo de la enzima que la produce cuando se encuentra deficiente.

Las EAG-I, EAG-III, EAG-VI y EAG-IX son similares en la presentación clínica y usualmente detectadas durante la primera infancia y niñez debido a falla en el crecimiento y marcada hepatomegalia.

En la Fig. 2 se exponen las principales consideraciones para diferenciar desde el punto de **vista** clínico-bioquímico las EAG hepáticas. Así, los desórdenes con acumulo de Glucógeno citosólico, degradación de la macromolécula, pueden presentarse como una enfermedad que solamente afecta el hígado (EAG-I, EAG-III, EAG-VI y EAG-IX), que involucran hígado y riñón (EAG-I) o con cardiomiopatía además de afectación hepática (EAG-III). Cabe mencionar que no existe característica clínica y/o bioquímica alguna en la primera infancia que permita orientar hacia una EAG-VI y EAG-IX (defectos en el sistema de la fosforilasa hepática).

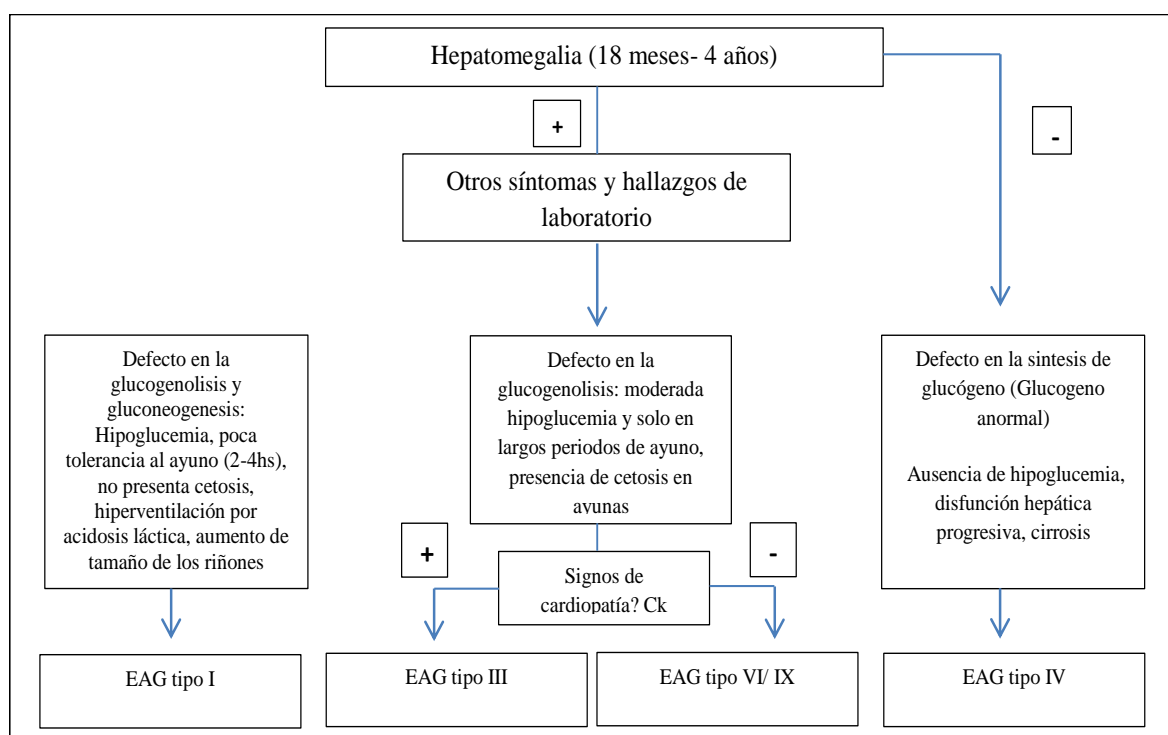


Figura 2. Diagrama de flujo para la diferenciación clínica y bioquímica de las Enfermedades de atesoramiento del glucógeno hepáticas ².

III- Defectos en el sistema de la fosforilasa hepática

Las antes mencionadas EAG-VI (MIM#232700) y EAG-IX (MIM#300798) son causadas por deficiencias en el Sistema de la Fosforilasa y representan el 25-30% del total de las EAG hepáticas.

La EAG-VI (enfermedad de Hers) es un desorden genético de herencia autosómica recesiva, producida por la deficiencia de la fosforilasa hepática codificada por el gen PYGL.

La EAG-IX es causada por un defecto genético en una de las cuatro subunidades ($\alpha\beta\gamma\delta$)₄ de la PHK ⁴. A nivel hepático se han identificado deficiencias en alguna de las subunidades de la PHK causantes de diferentes EAG-IX en el hígado y ellas son: 1) EAG-tipo IXa (MIM#306000) en donde la subunidad deficiente es la α codificada por el gen PHKA2 y de herencia ligada al cromosoma X. La EAG-IXa es el subtipo más

común de la EAG-IX y se describieron 2 variantes enzimáticas: XLG1 (actividad PHK disminuida en hígado y glóbulos rojos) y XLG2 (Actividad PHK disminuida en hígado y normal en células sanguíneas); 2) EAG tipo IXb (MIM#261750) producida por defectos en la subunidad beta codificada por el gen PHKB de transmisión autosómica recesiva y 3) EAG-tipo IXc, (MIM#613027) también de herencia autosómica recesiva y producida por defecto de la subunidad gamma, codificada por el gen PHKG2⁵.

La mayoría de los pacientes con defectos en el sistema de la fosforilasa hepática, EAG-VI, EAG-IXa, EAG-IXb y EAG-IXc, presentan hepatomegalia y estatura corta dentro de los 2 años de vida. El fenotipo puede ser moderado (hepatomegalia y hepatograma con enzimas elevadas) o severo (hipoglucemia, estatura corta, moderado retraso en la motricidad gruesa, enfermedad hepática progresiva: fibrosis que evoluciona a cirrosis). Bioquímicamente, los pacientes tienen un hepatograma alterado y riesgo de hipoglucemia en ayuno prolongado. Las manifestaciones clínicas y bioquímicas tienden a mejorar con la edad. La confirmación diagnóstica se basa en estudios de genética molecular para genes específicos. A su vez, se realiza la determinación de la actividad PHK en glóbulos rojos que como se especificó anteriormente, cuando se encuentra disminuida permite definir EAG-IX, sin embargo frente a una actividad eritrocitaria normal PHK no se puede descartar esta patología⁵.

a) Fosforilasa hepática y Gen PYGL

La *fosforilasa* es una enzima dimérica altamente regulada compuesta de dos subunidades idénticas, y se encuentra en dos diferentes formas, una inactiva llamada “*fosforilasa b*” y otra activa designada “*fosforilasa a*”. La fosforilación de un residuo serina específico (Ser 14), en cada una de sus subunidades, reacción catalizada por la proteína PHK, estabiliza la *fosforilasa* en la conformación activa y de este modo

interviene en la degradación de glucógeno a glucosa-1-fosfato (⁶Hendrickx J, 1996), (Fig. 3).

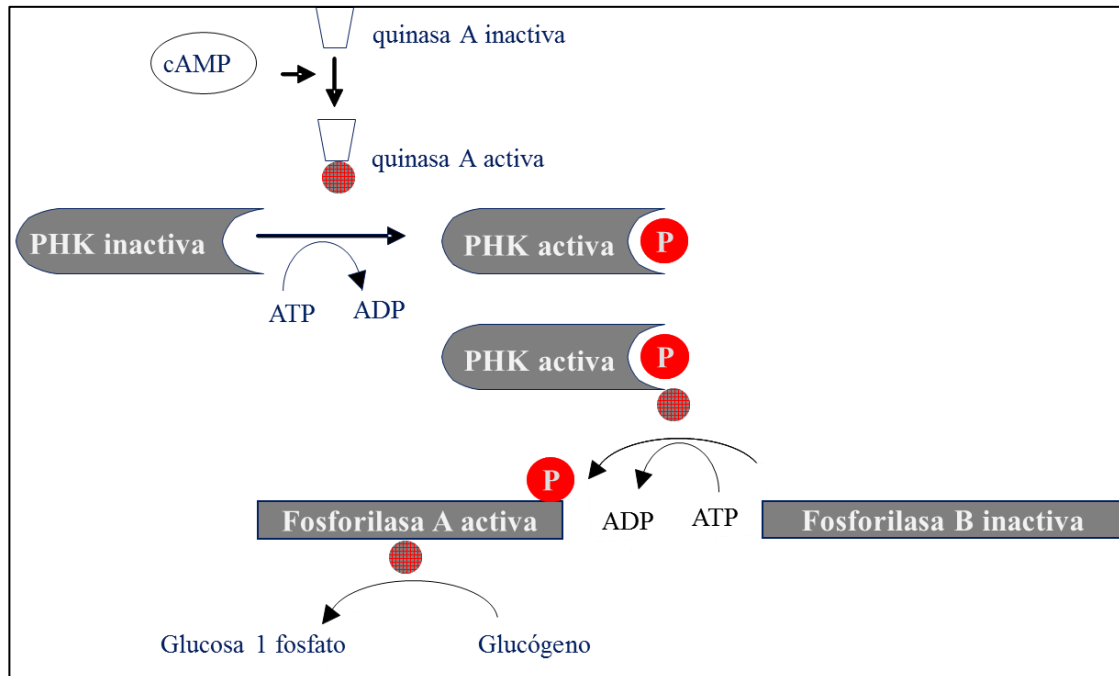


Figura 3. Sistema de la fosforilasa hepática. Cascada de activación de la fosforilasa hepática (deficiente en EAG-VI) por medio de la enzima PHK (deficiente en EAG-IX) que culmina con la liberación de glucosa-1-fosfato a partir de glucógeno.

Se conocen tres isoformas de la enzima fosforilasa: la isoforma muscular (M), la hepática (L) y la cerebral (B). Estas variantes son codificadas por genes distintos, PYGM (NM_005609), PYGL (NM_002863) y PYGB (NM_002862), que se localizan en los cromosomas 11, 14 y 20, respectivamente ^{1,6}. La isozima hepática, formada por 847 aminoácidos, es la responsable de la EAG-VI.

El gen PYGL que codifica para la fosforilasa isoforma hepática, se encuentra ubicado en el cromosoma 14q21- 22, contiene 20 exones, produce un único transcrito y se expresa exclusivamente en hígado.

Se han identificado 30 diferentes mutaciones en este gen, la mayoría de ellas son mutaciones missense resultando en la sustitución de dominios muy conservados que

afecta directamente la actividad enzimática^{7,8}. Además fueron encontradas mutaciones nonsense, pequeñas deleciones, pequeñas inserciones/deleciones, grandes inserciones, grandes deleciones, en sitio de “splicing” y corrimiento del marco de lectura. Solo 2 mutaciones se ha podido predecir que resultaran en alelos nulos (<http://www.hgmd.cf.ac.uk>).

b) Fosforilasa b quinasa y genes relacionados

Por otra parte, la PHK es una enzima clave que regula la degradación del glucógeno y es activada por la *proteína quinasa A* (PKA) dependiente de AMPc ante un estímulo con glucagón o adrenalina. Como se especificó anteriormente, la *PHK* así activada, es la responsable de convertir la forma inactiva de la *fosforilasa* a forma activa permitiendo la liberación de glucosa-1-fosfato (Fig. 3).

La PHK consiste en 4 subunidades ($\alpha\beta\gamma\delta$)₄ con una masa molecular de aproximadamente 1.3×10^6 Da^{1,6,7}. Las subunidades α , β y δ son importantes para la **regulación** de la actividad PHK, mientras que la subunidad γ es la subunidad **catalítica** de la enzima. Las 3 subunidades regulatorias inhiben la actividad fosfotransferasa de la subunidad γ . La proteína quinasa A dependiente de AMP cíclico fosforila las subunidades α y β en respuesta a adrenalina, lo cual libera la inhibición de la subunidad γ y activa la PHK.⁹ Además las subunidades α y β pueden ser autofosforiladas por la misma PHK en al menos 3 residuos serina (Fig. 4).

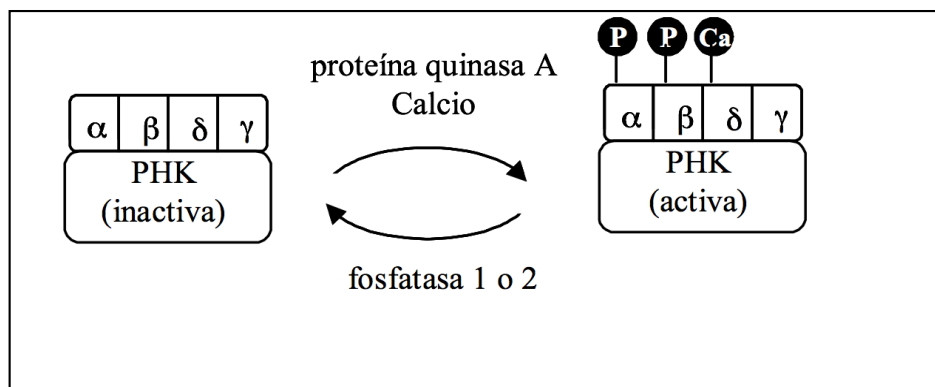


Figura 4. Representación esquemática de la regulación de la actividad de la PHK. http://en.wikipedia.org/wiki/File:PhK_diagram.png

La subunidad δ , también conocida como calmodulina, recibe señales Ca^{+2} intracelular y aumenta la actividad de la enzima disminuyendo la inhibición de la PHK vía la subunidad γ ⁶. La subunidad γ contiene un dominio quinasa, un dominio autoinhibitorio y un dominio de unión a la calmodulina ¹⁰, (Fig. 4).

Existen varias isoformas de cada subunidad, mientras que en algunas de estas isoformas las subunidades son codificadas por diferentes genes, otras resultan de “splicing” diferencial ⁶. Se han descrito diferentes subtipos de deficiencia de PHK que difieren en su modo de herencia y en el tejido afectado. Las distintas EAGs causadas por deficiencia de PHK se encuentran detalladas en la Tabla II.

La **subunidad α** tiene dos isoformas, una muscular (α_M) y otra hepática (α_L), que son codificadas por dos genes distintos ubicados en el cromosoma X, PHKA1 (transcripto 1: NM_002637, transcripto 2: NM_001122670) y PHKA2 (NM_000292), respectivamente ^{11,12}.

Como se mencionó anteriormente, la isoforma hepática de la subunidad α de la enzima PHK está codificada por el gen PHKA2 (NM_000292) ¹³; este gen se encuentra

ubicado en el cromosoma Xp22¹⁴, contiene 33 exones y codifica para una proteína de 1235 amino ácidos¹⁵.

Tabla II. Glucogenosis Hepáticas causadas por deficiencia en la PHK en humanos (EAG-IXa-c).

Gen mutado/Subunidad	Subtipo	Comportamiento de la PHK en tejidos	Herencia
PHKA2/ α L	XLG1	Hígado células sanguíneas	Ligada al cromosoma X
	XLG2	Hígado N/células sanguíneas	Ligada al cromosoma X
PHKB/ β	IXb	Hígado, células sanguíneas, músculo	Autosómica
PHKG2/ γ TL	IXc	Hígado, células sanguíneas	Autosómica

Hasta el presente, se registraron un total de 76 mutaciones responsables de producir EAG-IX hepática ligada al cromosoma X (MIM 306000) entre ellas se incluyen 44 mutaciones “missense” y “nonsense”, 5 alteraciones en sitio de “splicing”, 13 deleciones pequeñas, 6 grandes deleciones y 8 inserciones en el gen PHKA2 (<http://www.hgmd.cf.ac.uk>). De estas 76 mutaciones, 38 estuvieron asociadas a la variante XLG1 (actividad PHK deficiente en hígado y células sanguíneas) y 14 a la XLG2 (actividad PHK deficiente en hígado y normal en células sanguíneas).

Las mutaciones en el gen PHKB localizado en 16q12-q13, que codifica para la **subunidad β** de la PHK, causan un desorden de herencia autosómica recesiva que afecta a hígado y músculo.

El gen PHKB, de copia única, contiene 32 exones y presenta “splicing” alternativo de los exones 2, 26 y 27 generando transcritos específicos de tejido (transcripto 1: NM_000293, transcripto 2: (NM_001031835). La proteína que se expresa en hígado es codificada por el transcripto 2, y contiene 1086 aminoácidos ¹⁶. Se han identificado 18 mutaciones en este gen entre ellas 14 sustituciones (“missense”, “nonsense”, y de “splicing”), 1 inserción, 1 delección y 1 inserción/delección ¹⁷, (<http://www.hgmd.cf.ac.uk>).

Hay dos isoformas descritas para la **subunidad** γ : la forma muscular y la hepática-testicular. Estas isoformas son codificadas por los genes PHKG1 (isoforma muscular: NM_006213) y PHKG2 (isoforma hepático-testicular: NM_000294) ubicados en los cromosomas 7p11.7 y 16p12.1-p11.2, respectivamente ^{4,17}. Mientras que se identificaron variaciones en el gen PHKG2 causantes de deficiencia de PHK específica de hígado heredada en forma autonómica recesiva, no se han encontrado mutaciones en el gen PHKG1 ¹⁷.

El gen PHKG2 contiene 10 exones, y codifica una proteína de 406 aminoácidos. Han sido descritas 18 mutaciones, que incluyen mutaciones “missense”, “nonsense”, delecciones, inserción/delección y cambios en el sitio de “splicing” ¹⁷ (<http://www.hgmd.cf.ac.uk>).

La **subunidad** δ o calmodulina es un polipéptido de 16.5 kDa y tres genes independientes, CALM1 (NM_006888), CALM2 (NM_001743) y CALM3 (NM_005184), codifican para esta proteína pero no se han descrito deficiencia de PHK asociada con mutaciones en estos genes.

OBJETIVO GENERAL

Abordar a través del presente trabajo de Tesis, por medio de una evaluación interdisciplinaria biomédica, una temática inédita en nuestro medio que se enmarca dentro de una Investigación Clínica Aplicada en el área de la **Medicina Genética Metabólica**.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estandarizar el análisis molecular en el gen PHKA2 responsable de la EAG-IX hepática ligada al cromosoma X.
- Propender a la identificación de mutaciones en el gen PHKA2, causantes de deficiencia de la subunidad α de la enzima PHK en pacientes argentinos compatibles de padecer EAG-IX.
- Extender el hallazgo mutacional del caso índice a miembros disponibles de la familia involucrada a fin de establecer el estado de portador o heterocigota.
- Evaluar el grado de correlación genotipo-fenotipo de los pacientes argentinos documentados y establecer estudios comparativos con las comunicaciones foráneas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS AMPLIADOS A LOS PROPUESTOS EN EL TRABAJO ORIGINAL

- Diferenciar los defectos genéticos del sistema de la fosforilasa, EAG-IXa y EAG-VI, mediante una estrategia de análisis molecular.
- Estandarizar además del análisis molecular en el gen PHKA2 responsable de la EAG-IX ligada al cromosoma X, el del gen PYGL responsable de la EAG-VI.
- Identificar mutaciones en el gen PYGL causantes de deficiencias en la enzima fosforilasa hepática en pacientes argentinos compatibles de padecer EAG-VI.
- Extender el hallazgo mutacional del caso índice a miembros disponibles de la familia involucrada a fin de establecer el estado de portador o heterocigota.

I. Serie Patológica

Todas las muestras fueron obtenidas con el apropiado consentimiento de los pacientes y/o tutores involucrados en este estudio y el aval del Comité Interinstitucional de Ética de Investigaciones en Salud (CIEIS). A cada una de las familias analizadas se les asignó un número en orden creciente y se utilizó una sigla para su identificación (apellido y nombre) para cada individuo examinado (paciente como así también familiar) el cual permitirá su reconocimiento a lo largo de este escrito (Tabla III). En igual Tabla, se especifica la procedencia de cada familia estudiada.

La sospecha diagnóstica se basó en la compatibilidad fenotípica con defectos en el sistema de la fosforilasa hepática (EAG-VI y EAG-IX), en su inicio con caracteres de homotipismo, consistiendo por signos marcadores centrales, hepatomegalia y el hallazgo bioquímico, también compartidos en todos ellos, de hipoglucemia.

Tabla III. Pacientes y familiares incluidos en este estudio detallando número e identificación, análisis enzimático, procedencia y otros datos relevantes.

Familia	Nº Paciente Identificación	Análisis Enzimático	Procedencia	Otros Datos
I	1a/CK	Deficiente ¹	Corralito Prov. Córdoba	Primos con diagnóstico enzimático previo
	1b/BE madre			
	1c/BL tía materna			
II	2a/TP	Deficiente ²	Alta Gracia Prov. Córdoba	
III	3a/EV	Deficiente ²	Córdoba Capital	
IV	4a/AJU	ND	Prov. San Juan	Hermanos mellizos
	4b/AJI	ND		
	4c/madre			
	4d/padre			

Superíndice 1: Actividad Enzimática de PHK eritrocitaria disminuida.

Superíndice 2: Análisis de enzima Fosforilasa en muestra de biopsia de hígado disminuida.

A) Individuo con deficiencia en la enzima *PHK*.

El individuo estudiado fue 1 paciente de sexo masculino (CK). El diagnóstico inicial de EAG-IX se realizó mediante la medición de la actividad *PHK* en GR que resultó disminuida. Adicionalmente nos condujo al estudio molecular del gen *PHKA2* por ser primo hermano de 3 pacientes de nuestro centro diagnosticados enzimáticamente de padecer EAG-IX en la década de 1980 (BH1, BH2 y FW). En la Fig. 5 se presenta el árbol genealógico de la familia del paciente CK.

En el estudio molecular se incluyó al paciente y se extendió a aquellos miembros disponibles de su familia, su madre y 1 tía materna.

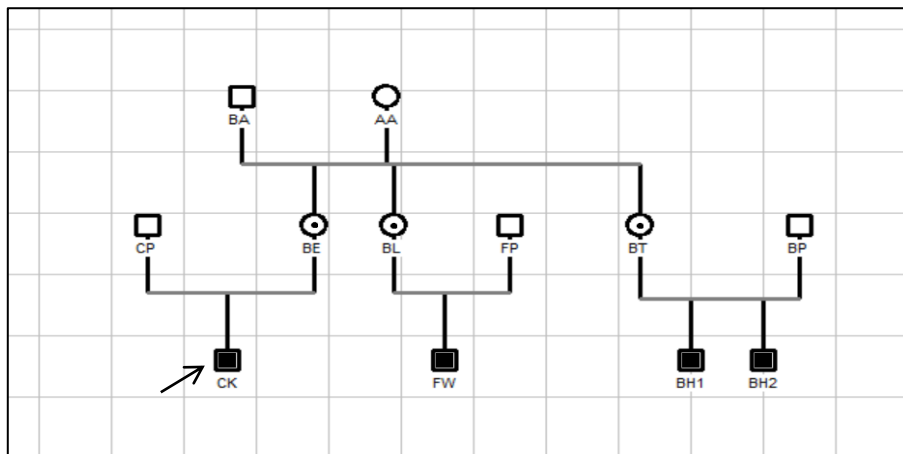


Figura 5. Árbol genealógico de la familia del paciente CK. Abuelos (BA/AA), Padres (CP/BE), Tíos (BL/FP/BT/BP), primos (FW/BH1/BH2). BE y BL portadoras confirmadas por diagnóstico molecular.

B) Pacientes compatibles con una deficiencia del sistema de fosforilasa

Se incluyeron 4 pacientes, 3 mujeres (TP, EV, AJI) y 1 varón (AJU), pertenecientes a 3 familias no emparentadas. Las mujeres TP y EV fueron diagnosticadas como EAG-VI mediante determinación enzimática de la Fosforilasa realizadas en muestras de hígado en la década de 1980 en nuestro laboratorio. Los pacientes AJI y AJU, hermanos mellizos, sin diagnóstico enzimático fueron sometidos a estudio

molecular para su definición nosológica, también fueron incluidos en el estudio los padres de estos pacientes. En las Fig. 6, 7 y 8 se presentan los árboles genealógicos de las familias incluidas en el estudio del gen PYGL.

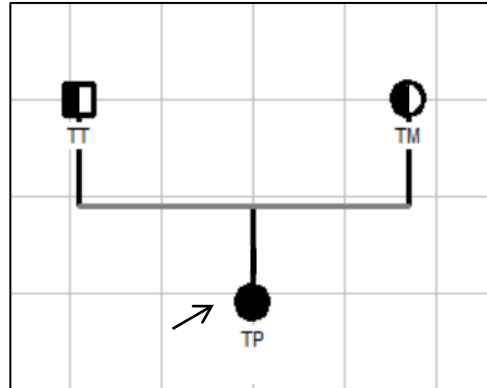


Figura 6. Arbol genealógico de la familia paciente TP

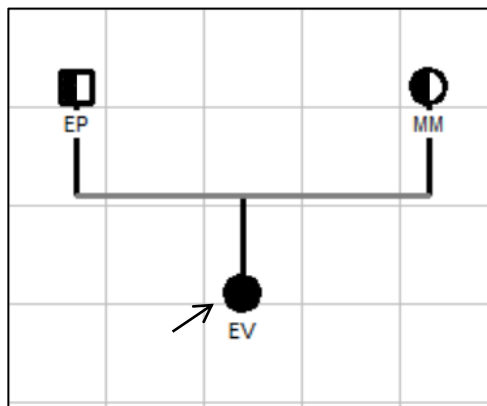


Figura 7. Árbol genealógico de la familia de la paciente EV

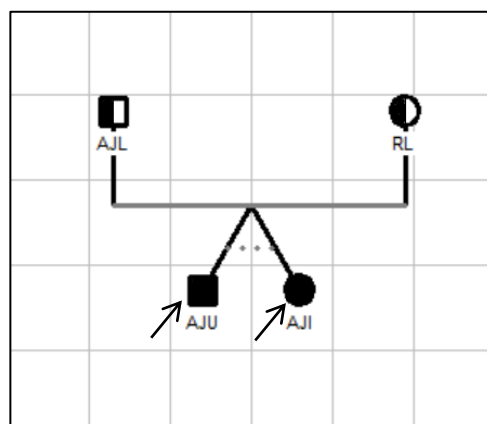


Figura 10. Árbol genealógico de la familia de los pacientes AJU y AJI

II. Serie control normal: estandarización metodológica

Se dispuso de muestras de individuos controles normales, para ser utilizadas en la puesta a punto de la metodología propuesta en esta investigación.

ANÁLISIS MOLECULAR DE LA EAG TIPO IX LIGADA AL CROMOSOMA X

1) A partir de ADNc PHKA2

a) Obtención de pella leucocitaria

Se obtuvieron leucocitos a partir de 5 mL sangre entera anticoagulada con EDTA 0.1 M en un tubo de 10 mL utilizando 5mL Dextran 3%, se dejó sedimentar 1 hora, y se transfirió el sobrenadante a otro tubo nuevo, se centrifugo a 2000rpm durante 10 minutos se descartó el sobrenadante y se realizó sucesivos lavados con solución fisiológica, agua bidestilada y NaCl 3.6 %. Una vez que se obtiene la pella de leucocitos se suspendió en 3mL de PBS. Para la cuantificación de leucocitos se separó una alícuota de 300µl y se midieron las células en contador hematológico Sysmex.

b) Extracción y cuantificación de ARN

El ARN total de leucocitos de pacientes controles normales y pacientes con EAG-IX se aisló según procedimiento establecido utilizando TRIZOL (Invitrogen, Life Technologies, EEUU).

El procedimiento se inició colocando 10.000.000 de células en un tubo *eppendorf*[®] 1,5mL, estéril y libre de Rnasa, y se agregó 1 mL de trizol. Se homogeneizó con una pipeta automática, en esterilidad. Luego de homogeneizadas, se incubó durante 5 min a temperatura ambiente, seguido de 200 µl de cloroformo, y se agitó vigorosamente durante 15 seg. Luego se incubó a temperatura ambiente durante 2 o 3 min. Se prosiguió con centrifugación de las muestras por 20 min a 12,000g a 4°C, transferencia de la fase superior acuosa a otro tubo *eppendorf*[®]. El ARN fue precipitado de la fase superior acuosa mezclándolo con 500 µl de isopropanol. Se dejaron las

muestras a temperatura ambiente en reposo 10 min y se centrifugaron a 12,000g durante 10 min. Remoción del sobrenadante y lavado del precipitado de ARN con 1 mL de etanol 75%. Centrifugación a 7,500 g por 5 min a temperatura ambiente. Remoción del etanol y el precipitado de ARN se secó brevemente al aire, el precipitado se disolvió en 20 µl en agua libre de nucleasas (Promega). Las muestras fueron guardadas a -80°C hasta su utilización.

La cuantificación del ARN se realizó a partir de la suspensión congelada, se calentaron las muestras de ARN total durante 10 min a 65°C para resuspender el ARN, y se diluyó 1 µl del mismo en 1 ml de agua (por duplicado). Se utilizó un espectrofotómetro Beckman y se midió la absorción a 260 nm, la cual refleja la cantidad de ARN y a 280 nm, indicativa de la cantidad de proteína. La relación entre 260/280 de todas las muestras utilizadas estuvo comprendida entre 1,7 y 2 estipulado para lograr un resultado óptimo. La integridad del ARN se comprobó corriendo 1mg del mismo en un gel desnaturizante de agarosa al 1,2% y visualizando el ARN en un transiluminador con luz ultravioleta.

c) Análisis del ADNc PHKA₂

Un total de 5µg de RNA leucocitario se sometió a la reacción de transcripción reversa (RT-PCR) según el procedimiento detallado en el equipo “SuperScript III First-Strand” (Invitrogen, Carlsbad, USA). Las condiciones en las que se llevó a cabo la RT-PCR fueron las siguientes: 5 min a 65°C, enfriamiento en hielo durante 1 min, e incubación durante 50min a 55°C y 10min a 85°C.

Todas las reacciones de amplificación del ADNc PHKA₂ por PCR se llevaron a cabo en un volumen final de 60 µl conteniendo: 50mM KCl, 1,5mM MgCl₂, 10mM Tris-HCl pH 9.0, 0,2mM de cada uno de los cuatro deoxiribonucleosidos trifosfatos (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 100 pmol de cada oligonucleótido específico, 2,5

Unidades de "Taq DNA polimerasa" y aproximadamente 6µl de ADNc. En la Tabla IV se detallan los oligonucleótidos (sentido y antisentido) que se diseñaron considerando la secuencia del ADNc PHKA2 obtenida de la base de datos ENSEMBL (<http://www.ensembl.org>), el tamaño de los fragmentos amplificados y la temperatura de hibridación.

Tabla IV. Fragmentos amplificados del ADNc PHKA2, secuencia de los oligonucleótidos específicos, tamaño del producto y temperatura de reacción.

Fragmentos ADNc PHKA2	Secuencia de Oligonucleótidos (sentido y antisentido)	Tamaño (pb)	Temperatura (°C)
1	5' CATCCCAAGAACCGACTA 3' 5' ACGCTCCCACATTCCATA 3'	678	55
2	5' CACGCCAAGTACAACACC 3' 5' CTCTGATGAGTATTCCCTCC 3'	748	57
3	5' ATGCTGTCGCTTCCTTCG 3' 5' TACGGTCGCCCACTCAA 3'	621	50
4.1	5' TTGCCGCTGGTGAATCG 3' 5' CCATCATTTGTGAGCATGGT 3'	472	57
4.2	5' GCA CCT GCT GGA GGA TGA 3' 5' TCG TCT TGG CTT TCT TGA TTA C 3'	325	53
5	5' TGG AGG AGC CAG AGT AAA 3' 5' GAT GTA GCG AAT CAG ACC C 3'	697	50
6	5' GAA CCT ACA GGA CCA AGC 3' 5' CTC GTG GAT GGA GAT GGT 3'	646	55
7.1	5' AGG CTT CTG AAA GTT TGA TG 3' 5' TCG CAG ACT TGG AGG AAT 3'	300	55
7.2	5' GAT GAA CAG TTC TTT TCT GTG 3' 5' TTT CTC CAG GGT GTC CAT 3'	522	55
8	5' AGA CTC GGG AGG ACA TCA 3' 5' CAG AAG GTT CCC AGT AAG G 3'	626	52

Las reacciones se llevaron a cabo a través de 30- 40 ciclos dependiendo el fragmento, comenzando con un tiempo de desnaturalización previa durante 5 min a 96°C y luego cada uno de los ciclos consistió en 1 min de desnaturalización a 96°C, 30 seg o 1 min de hibridación a la temperatura (T°) apropiada para cada par de cebadores, 1

minuto de extensión a 72°C y por último una extensión final de 7 min a 72°C. Los productos de amplificación se analizaron en geles de agarosa al 1% (Amersham, GE) y se visualizaron con Bromuro de Etidio 0,5mg/mL. Los productos de PCR se purificaron a partir de geles según procedimiento establecido en el kit ILUSTRA GFX PCR DNA (GE). Posteriormente, los productos de PCR purificados fueron sometidos a secuenciamiento directo (Unidad de Genómica. Instituto de Biotecnología, INTA (<http://www.inta.gob.ar>)).

2) Análisis del gen PHKA₂ a partir de ADN genómico

a) Extracción y cuantificación de ADN

La extracción del ADN genómico se realizó a partir de sangre entera anticoagulada con EDTA 0,1M de acuerdo al protocolo de purificación de ADN de “Wizard Genomic DNA Purification Kit” (Promega).

b) Amplificación y Estudio del gen PHKA₂

Los 33 exones y las uniones intrón/exón del gen PHKA₂ se amplificaron de manera independiente por PCR. Todas las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un volumen final de 50 µl: 200 ng ADN genómico, 50mM KCl, 1,5mM MgCl₂, 10Mm Tris-HCl pH 9.0, 0,2mM de cada uno de los cuatro deoxiribonucleosidos trifosfatos (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 100 pmol de cada oligonucleótido específico, y 2,5 Unidades de Taq DNA polimerasa. Teniendo en cuenta la secuencia obtenida de la base de datos ENSEMBL (<http://www.ensembl.org>), se diseñaron para este trabajo los oligonucleótidos utilizados en cada reacción detallados en la Tabla V, a su vez también se describe el tamaño de los productos de PCR y las condiciones de temperatura de hibridación. Las reacciones se llevaron a cabo a través de 30- 35 ciclos dependiendo el exón, comenzando con un tiempo de desnaturalización previa durante 5 min a 96°C y luego cada uno de los ciclos consistió en 1 minuto de desnaturalización a 96°C, 30 seg o

Tabla V. Secuencias de oligonucleótidos, tamaño del fragmento amplificado y temperatura de hibridación en las reacciones de PCR en el análisis del gen PHKA2.

Exones y uniones intrón/exón ADN PHKA2	Secuencia de Oligonucleótidos (sentido y antisentido)	Tamaño (pb)	Temperatura (°C)
1	5'CTCTGGTTGGCTTGCTTTC 3' 5'AGACCTGGGAAGGAGAATGA 3'	344	53
2	5'GTGAGGAACTAAGGTGCTG 3' 5'GTTCAAGGAGAAGGTGGC 3'	407	53
3	5'CTTGCCAGCCACAGTGAT3' 5'AATTACAATGACATGGAATGC3'	186	57
4	5'TCCCAGAAGTAGCAGATAAGA3' 5'CTACTGTCCTCCTCCAC3'	353	51
5	5'TTCCCTCCTTCCTTCCCTC 3' 5'AACAGCCTGGCCCTCAA 3'	363	58
6	5'TCCGAGAAGATCCACTTA3' 5'CTTGATGCTGACTTTTGACA3'	316	51
7	5'TTTCATTACCTTTGGGAAA3' 5'TATCACCAAGCCAGCAAG3'	310	51
8	5'GCCTGAGGAATAGGAATC3' 5'GAGAACCAAGCCACTAAAT3'	516	51
9	5'CCAAGTACCGATCAAACC3' 5'TCAGCAGAGGGAGAACA3'	324	53
10	5'AAAATCCTACTCATGCCAAC3' 5'ACCGAAACAGTGACCTAAAT3'	355	53
11	5'TAACACTGTAAGGTGCCTC 3' 5'AAAGAATACCAACAGGCCAA 3'	349	55
12	5'CACCTCCGCTGCTTTGTA 3' 5'GAGTCCCTATGCCCTTCT 3'	372	55
13	5'AGTGGCAGTTTGAATGAT 3' 5'TTTGTGGTTGGGAAGAAT 3'	449	50
14	5'AGGACGAACACTGTCATTT 3' 5'ACCGCCTGCTTTAGTTTT 3'	412	50
15	5'GAAGAACCAAGCCCCAAAAT 3' 5'ACGCCTGTCTCAAAAAGCAT 3'	421	51
16	5'CAGGCAGCAGACTGATTT 3' 5'CATAGAAGATTCCCCGAGATA 3'	471	50
17	5'GGTTTGGGCTCTTACAAATG 3' 5'CTGCATGCTTTTAGGTTCAA 3'	392	55
18	5'TCAGTGTGATTCATTTGGCT 3' 5'TCATTTGCAGTTTCGGTTTT 3'	594	56
19	5'GCTTGCTACCCATGGTCACT 3' 5'GGGCATTTTGTGCTTCT 3'	364	50
20	5'GCGAAATCCGTCCTACTA 3' 5'CGAAGTGATTGGGTTACAC 3'	666	58
21	5'AGTCATTGAAAAGTGGAGCA 3' 5'AGAAGGCCAAGAATACTACG 3'	691	56
22	5'ACCACGTCTGATGTTAGGC 3' 5'ATGGGGCTCCTTACAAGTA 3'	449	52
23-24-25	5'CTGCCTGTCTGTCGTCTTTG 3' 5'GGATGCTGGGTTTCGAGATAA 3'	783	52
26	5'ATTTAGAATCCCCACGGAAC 3' 5'TCTCTTCCCACATTCGCTAT 3'	381	55
27	5'ACCTGTGCTGCTCTCGGTGC 3' 5'GTTAAGGATGAGTGGGTAAGGG 3'	472	59
28	5'ACTCGAATTTTCTGCTCCAT 3' 5'CTCTACACATTCACACGCT 3'	313	55
29	5'GCTGCTTTCTGTGGGTGTTT 3' 5'CACTTTGGGGCCTTCTTTCT 3'	333	58

Tabla V. Secuencias de oligonucleótidos, tamaño del fragmento amplificado y temperatura de hibridación en las reacciones de PCR en el análisis del gen PHKA₂. Continuación.

Exones y uniones intrón/exón ADN PHKA ₂	Secuencia de Oligonucleótidos (sentido y antisentido)	Tamaño (pb)	Temperatura (°C)
30	5'GTGGTGTCTGGCATTGTG 3' 5'ATCCTCAGGGCTGTGTGTTT 3'	383	50
31	5'TCTGAAAGATGCCTGCTGGG 3' 5'CTGATGCCAATAAATGCTGG 3'	468	59
32	5'GCTACGGTCACCCTTGGTTA 3' 5'GACACAGAATCTCCAGCCTCAA 3'	353	52
33	5'CTCAGAAGGCCAAGGCTCTA 3' 5'AGGGTGAGTGCTACCATTGC 3'	450	52

1 min de hibridación a la temperatura (T°) apropiada para cada par de cebadores, 1 minuto de extensión a 72°C y por último una extensión final de 7 minutos a 72°C.

Los productos de amplificación se analizaron en geles de agarosa al 1% (Amersham, GE) y se visualizaron con Bromuro de Etidio 0,5mg/mL.

Los productos de PCR se purificaron y se sometieron a secuenciamiento directo como se detalló anteriormente (*análisis del ADNc PHKA2*).

ANÁLISIS MOLECULAR DE LA GLUCOGENOSIS TIPO VI

1) Análisis del gen PYGL a partir de ADN genómico

a) Extracción de ADN genómico y amplificación del gen PYGL

La extracción del ADN genómico se realizó siguiendo igual procedimiento que el descrito en el análisis del gen PHKA₂. Los 20 exones y las uniones intrón/exón del gen PYGL se amplificaron de manera independiente por PCR utilizando oligonucleótidos diseñados en este trabajo, teniendo en cuenta la secuencia obtenida de la base de datos ENSEMBL (<http://www.ensembl.org/index.html>). El volumen final de cada reacción de PCR como así también las concentraciones de cada reactivo utilizado son las mismas que se especificaron en las reacciones de amplificación del gen PHKA₂. En la Tabla VI se detallan las secuencias de oligonucleótidos (sentido y antisentido)

utilizados en cada reacción de PCR, el tamaño de los productos obtenidos, como así también la temperatura de hibridación.

Tabla VI. Exones amplificados del gen PYGL, secuencias de oligonucleótidos específicos, tamaño de los fragmentos y temperatura de reacción.

Exones gen PYGL	Secuencia de Oligonucleótidos (sentido y antisentido)	Tamaño (pb)	Temperatura (°C)
1	5' AAA CTT TCG TGC GCG TTG 3' 5' TGA GTT CGG CGT CTG TTG G 3'	569	53
2	5' CCT GTG ACT TAG AAT GCC AAA C 3' 5' CAA TGT CCC CAA GTT TCC TG 3'	425	53
3	5' CAT CTC ATA CAG TTT GCC TCT 3' 5' AGC CTG CCT GGT TCT TGC 3'	354	53
4	5' TGC CAT GTG TTT TAG GGA AAG 3' 5' AGG TGC TCC ACA ATC AGG 3'	475	53
5	5' GCG AGT ATT ATT GTT GAT GTA GGC 3' 5' GGC TGC GCT AAG AGA AGT A 3'	462	53
6	5' ATA TCA GGG CAA GGG CAC A 3' 5' CCC TAC TTC CTC CAT ACA 3'	546	55
7	5' GCA GGC ATT GTA TGG AG 3' 5' ACT TGG TTG GGA GGA GAA 3'	450	50
8	5' AGC AAA GGC TCA CAG TTT 3' 5' CTG GCT TCT TTG TCC TAA 3'	476	50
9	5' CGT TGA GCA GGA ATA GTG TG 3' 5' GAT GGA AAA TGT CAG CGT CA 3'	383	53
10	5' TTG GAA TGG TCC TGT TGC 3' 5' CAT CCC TCC ATT TCA GCA 3'	428	53
11	5' TCC CTG TGG TAG TGA AGT 3' 5' GCC TTT CCT CAT CCC TAA 3'	381	50
12	5' TAC TGT CAG CCT GTC CCT 3' 5' CAG CCT GGG TGA TAG AGT 3'	492	50
13	5' AAA CTG CCC ATT TGG ACT TG 3' 5' GAT AAT CGC TTG AAC CTG 3'	334	55
14-16	5' AAA CCA GAC CAC CCA ATT 3' 5' TGC CCC ATC TTT CAT ACC AT 3'	709	50
17	5' CCT GAG TCA AGG GGA AAG AG 3' 5' TGT TCT GCT GCC ACC TCT 3'	509	56
18	5' TTG AAA TGG ACC TTG CTG 3' 5' CCC AAG CCT AAA CTA CCT 3'	604	50
19	5' CAG CGA TGC CAG TAA GGT 3' 5' CTG AGT GAC AGA GCG AGA 3'	628	50
20	5' TGT TTG GAT GTG CTT GGC 3' 5' CCC ACA GGG ACT AAG ACA 3'	642	55

El ciclado comenzó con un tiempo de desnaturalización previa de 5 min a 96°C, luego 30 a 35 ciclos, dependiendo del exón, de 1 min de desnaturalización a 96°C, 30 seg o 1 min de hibridación a la temperatura (T°) apropiada para cada par de cebadores y 1 min de extensión a 72°C y por último una extensión final de 7 minutos a 72°C. Los

productos de PCR se purificaron y se sometieron a secuenciamiento directo como se detalló arriba (*análisis del ADNc PHKA2*).

ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO

Análisis computacional para predecir el efecto de variaciones génicas utilizando herramientas bioinformáticas de bases de datos públicas y programas de software

1) Cambios “missense”

- ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>): es un programa de alineamiento de secuencias múltiples para DNA o proteínas. ClustalW2 calcula la mejor combinación para las secuencias seleccionadas y las alinea de manera que se puedan ver las identidades, similitudes y diferencias. Se establecieron los alineamientos de las secuencias de la enzima glucógeno fosforilasa y PHK conocidas de distintas especies en la región de los cambios missense nuevos.
- Polymorphism Phenotyping-2: PolyPhen-2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>) para obtener Cálculos Independientes Específicos de Posición (PSIC): PolyPhen-2 es una herramienta que predice el posible impacto de la sustitución de un aminoácido (AA) 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. Las mutaciones son valoradas cualitativamente como benignas/ posiblemente perjudiciales/ probablemente perjudiciales sobre la base de la tasa de falsos positivos del modelo. Si la falta de información no permite hacer predicción, el resultado es reportado como desconocido.¹⁸⁻²⁰.
- Sorting Intolerant From Tolerant (SIFT, <http://sift.jcvi.org/>) El programa SIFT predice si la sustitución de un AA afecta la función de la proteína basándose en la homología de secuencia y las propiedades físicas de los aa. Esta herramienta

ordena las sustituciones de intolerantes a tolerantes, clasificándolas como toleradas o deletéreas²¹⁻²⁵.

2) Cambios en sitios de “splicing”

- MaxEntScan: *puntuación de sitios de corte y empalme 3'* (http://genes.mit.edu/burgelab/maxent/Xmaxentscan_scoreseq_acc.html/): este programa permite reconocer los sitios de corte y empalme en 3' y 5'. Se aplica a la predicción del efecto de cambios intrónicos. El éxito de los algoritmos para encontrar genes depende críticamente de distinguir las señales que marcan los límites exón-intrón, las cuales son reconocidas en las células por la maquinaria nuclear de eliminación de intrones. Las dos señales más importantes son los sitios de corte y empalme 5' (5'ss) y el 3' (3'ss), que demarcan el comienzo y el final de cada intrón respectivamente. MaxEntScan es un modelo probabilístico que propone un marco de motivos de secuencia para modelado, basado en el principio de la máxima entropía²⁶. El programa permite la discriminación entre sitios de corte y empalme humanos 5' (dador) y 3' (aceptor) verdaderos, de señuelos. Asigna valores más altos a los verdaderos 5'ss o 3'ss, y más bajos a los señuelos cuando todos los otros factores están igualados. La estrategia de búsqueda clasifica los límites en la resolución de nucleótidos apareados en posiciones específicas, lo cual es útil para determinar las correlaciones con factores de unión. El resultado que arroja el programa es una puntuación entre 0 y 1 para un sitio de empalme potencial²⁷.
- Neural Network (www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html): se basa en el Modelo de Markov para reconocer sitios de empalme 5' y 3', utilizando un conjunto de datos representativos. Sólo se consideran los genes que tienen sitios de empalme consenso, es decir, GT y AG para los sitios de corte y empalme de intrones 5' y

3', respectivamente. Indica con que probabilidad se producirá el proceso de eliminación de intrones en cada caso. Además, informa sobre nuevos sitios de corte y empalme que pueden existir a lo largo del intrón y/o exón.

ALGORITMO PROPUESTO PARA LA INVESTIGACIÓN DE LOS DEFECTOS DEL SISTEMA DE LA FOSFORILASA HEPÁTICA

En la Fig. 11 se presenta el algoritmo diseñado como estrategia diagnóstica y diferencial de los defectos del sistema de la fosforilasa hepática, es decir entre las EAG-VI y EAG-IX. En el algoritmo se describen pasos secuenciales que dependen del sexo del paciente y de la medición de la actividad fosforilasa b quinasa en glóbulos rojos.

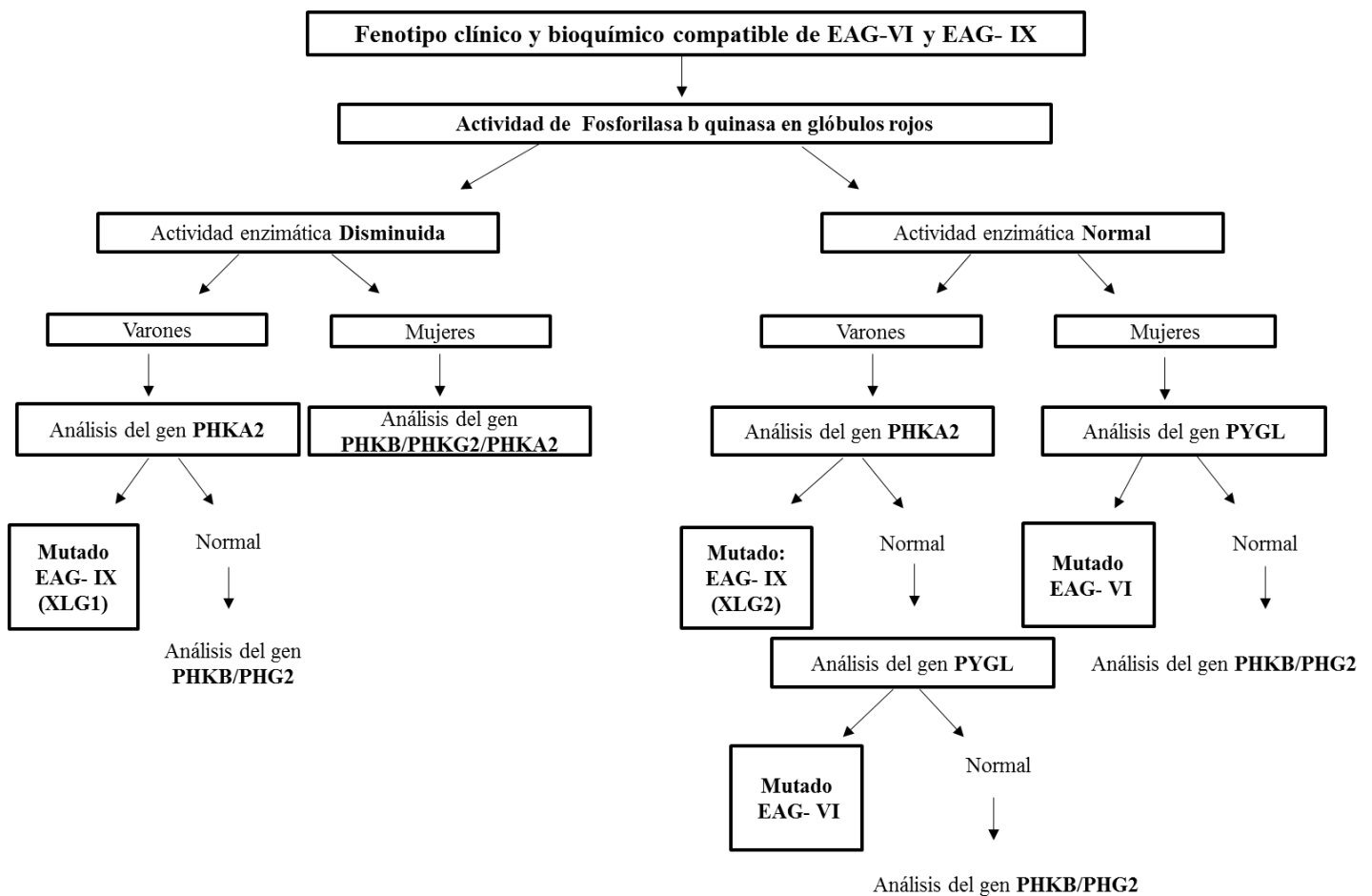


Figura 11. Algoritmo propuesto para investigar defectos en el Sistema de la Fosforilasa Hepática.

Los resultados presentados en este apartado no solo contempla el análisis molecular de la EAG-IX ligada al cromosoma X, que es el objetivo específico del presente trabajo, sino también se incluyó el estudio del gen PYGL causante de la EAG-VI. Ambas patologías, EAG-IXa y EAG-VI, indistinguibles entre sí desde el punto de vista clínico-bioquímico en la primera infancia son las principales causas de los defectos del sistema de la fosforilasa.

En base al algoritmo diseñado y propuesto para este estudio, explicado en el apartado de métodos (Fig. 11), el paso inicial que se plantea son las manifestaciones clínicas de los probandos, en términos generales todos presentaron hepatomegalia moderada y crecimiento acorde a la edad cronológica. En relación a los parámetros bioquímicos, la concentración de glucosa en sangre estuvo disminuida o bien sólo se desarrollaba después de ayunos prolongados o infecciones. Se determinó el perfil lipídico en las pacientes EV y TP el cual presentó un mayor predominio del colesterol.

Según el algoritmo propuesto para la investigación de los defectos del sistema de la fosforilasa, las consideraciones siguientes que se deben tener en cuenta son la actividad de PHK en glóbulos rojos y el sexo de los pacientes para luego direccionar el análisis molecular en el gen PHKA2 o PYGL. En forma anticipada, se presentan en la Tabla VII los resultados obtenidos de todos los pacientes analizados en este trabajo, hallazgos que a continuación se desarrollarán. En esta Tabla se especifica los valores de las actividades de PHK determinadas en células sanguíneas como así también los resultados del análisis molecular del gen PHKA2 y PYGL causantes de las EAG-IXa y EAG-VI, respectivamente.

Tabla VII. Actividad PHK en glóbulos rojos de pacientes con Defectos en el Sistema de la Fosforilasa. Análisis molecular en el gen PHKA2 Y PYGL

Pacientes	Sexo	Actividad Enz (VR:80-200 $\mu\text{molPi}/\text{min}/\text{g Hb}$)	Análisis molecular gen PHKA2/PYGL			
			Gen PHKA2			
			Alteración en el ADNc		Efecto en proteína	
Paciente CK	M	0	c.1042-1G>A			
			Gen PYGL			
			Mutación 1		Mutación 2	
			Alteración en el ADNc	Efecto en proteína	Alteración en el ADNc	Efecto en proteína
Paciente EV	F	197.1	c.2056 G>A	p.Gly686Arg	c.2056 G>A	p.Gly686Arg
Paciente TP	F	108.1	c.698 G>A	p.Gly233Ser	c.2056 G>A	p.Gly686Arg
Paciente AJU	M	ND	c.2 T>A	p.Met1Lys	c.2017 G>A	p.Glu673Lys
Paciente AJI	F	ND	c.2 T>A	p.Met1Lys	c.2017 G>A	p.Glu673Lys

ND: no determinado

EAG-IX ligada al cromosoma X. Gen PHKA2

El resultado de la actividad nula de la PHK en glóbulos rojos del paciente CK, de sexo masculino, dirigió la investigación hacia una posible EAG-IX ligada al cromosoma X, es decir direccionó el estudio molecular hacia el gen PHKA2. Adicionalmente, el probando CK es primo hermano de tres pacientes, de sexo masculino, que fueron previamente diagnosticados por ensayo enzimático, de padecer EAG-IX, miembros no disponibles para el estudio molecular (BH1, BH2, FW) (Fig. 12).

El estudio del gen PHKA2 en el paciente CK definió su condición de hemicigota mutado encontrándose un cambio de G>A en posición -1 del sitio aceptor de “splicing” del intrón 10 (c.1042-1G>A) llegando al diagnóstico definitivo de EAG-IX ligada al cromosoma X con variante XLG1 (EAG-IXa con

actividad PHK disminuida en glóbulos rojos). La identificación del cambio génico c.1042-1G>A permitió investigar la presencia de esta variación y confirmar el genotipo heterocigota en la madre (BE) y una tía materna (BL) con antecedentes de tener 1 hijo afectado (FW) de EAG-IX. En la Fig. 12 se muestra el árbol genealógico de la familia del probando CK, en donde se incluyen los genotipos detectados en los miembros de la familia estudiados y en la Fig. 13 se muestran los electroferogramas en forma parcial tanto del paciente que muestra la sustitución hallada de G>A en el sitio aceptor de “splicing”, posición -1 del intrón 10 (c.1042-1G>A), como la presencia de este cambio en un alelo de la madre y tía.

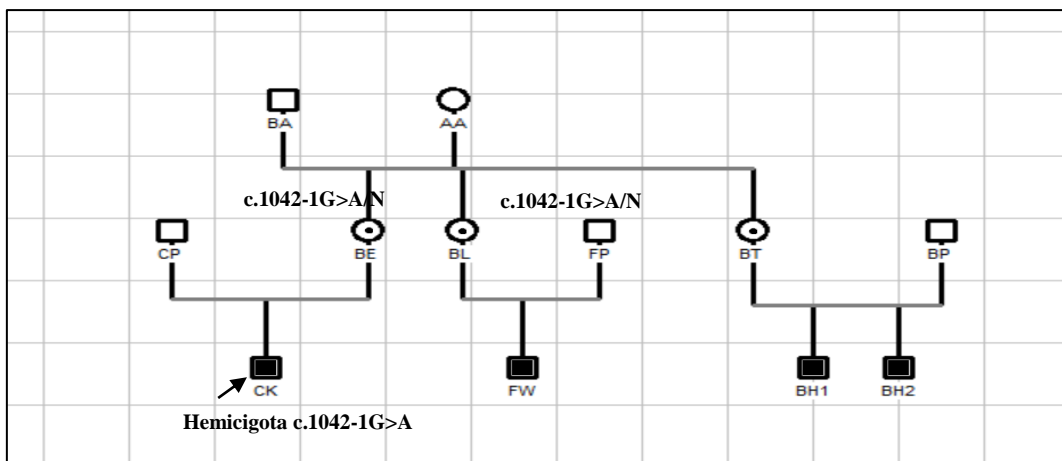


Figura 12. Árbol genealógico de la familia del paciente CK. Genotipos encontrados: hemicigota c.1042-1G>A en CK y heterocigota c.1042-1G>A/Normal en su madre BE y tía BL. N: alelo normal.

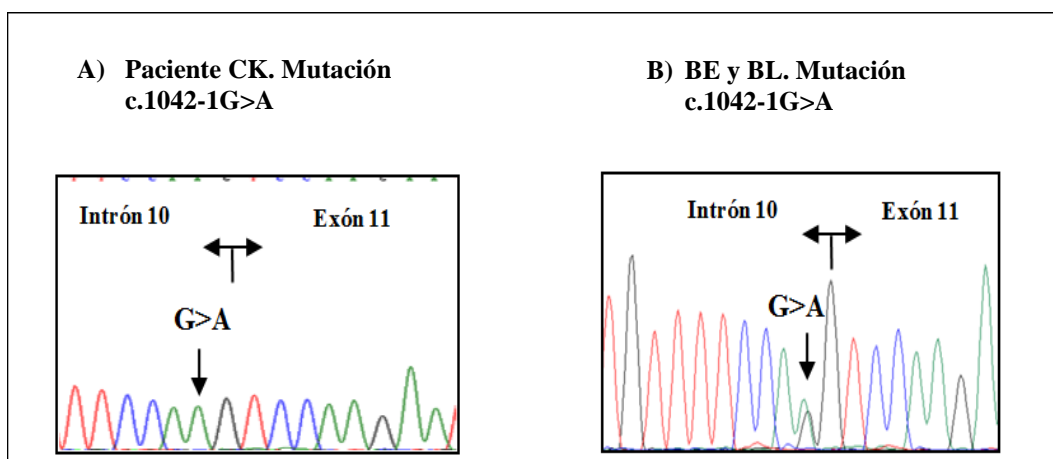


Figura 13. Electroferogramas que muestran: A) el cambio de G>A en posición -1 en el sitio aceptor de “splicing” del intrón 10 del gen PHKA2 en el paciente CK. B) la sustitución c.1042-1G>A en el gen PHKA2 en un alelo (heterocigosis) de la madre (BE) y tía materna (BL) del paciente.

La mutación c.1042-1G>A, no descrita en la bibliografía, condujo a la utilización de algoritmos predictivos que indiquen la probabilidad de que la presencia de esta variación génica afecte el mecanismo de corte y empalme del intrón 10 en el transcripto primario del gen PHKA2. Un primer análisis bioinformático de la mutación c.1042-1G>A se efectuó mediante el programa MaxEntScan: puntuación predictiva en sitios de corte y empalme (ME). Según el programa ME, cuanto más alto es el puntaje, mayor es la probabilidad de que la secuencia determinada sea el sitio de empalme verdadero. Para el alelo normal, el programa calcula una puntuación de 7.05 lo que indica que el proceso de corte y empalme de intrones se lleva a cabo (Fig. 14). Para el alelo mutado este programa arroja una puntuación de -1.70, por lo tanto la probabilidad de que este sitio de empalme sea reconocido es casi nula.

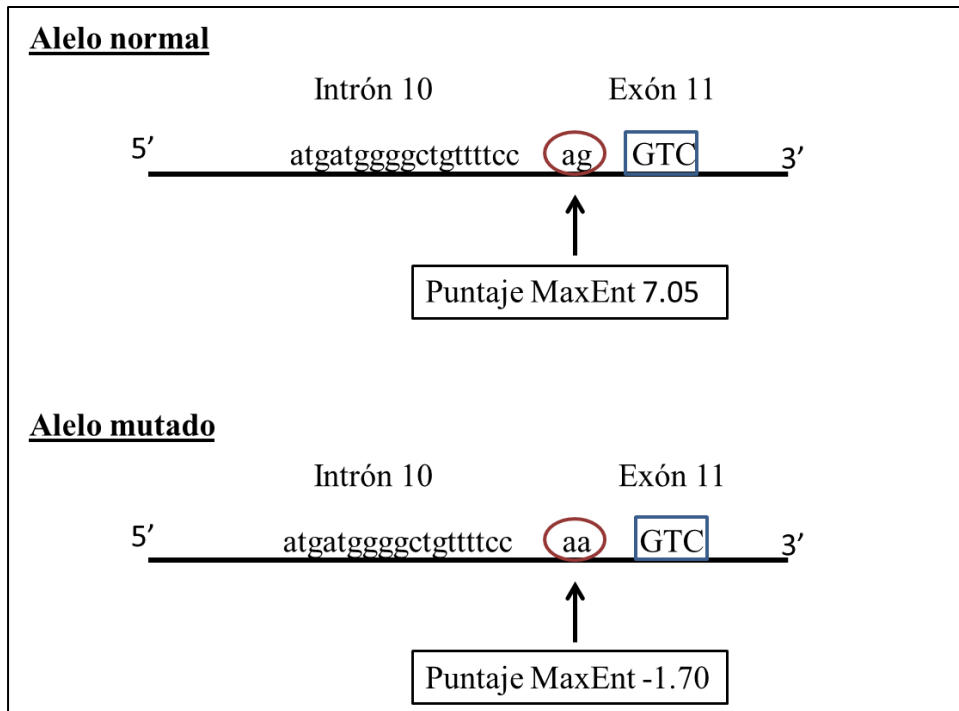


Figura 14. Análisis bioinformático de la mutación c.1042-1G>A del gen PHKA2. Resultados predictivos obtenidos con el programa ME. Se muestra el resultado numérico arrojado por el programa. Un número positivo alto (7.05) es indicativo que el proceso de corte y empalme se realiza; con el cambio, disminuye significativamente e incluso arroja un número negativo, es decir que la probabilidad para que este sitio de corte y empalme sea reconocido es baja. Los rectángulos en las secuencias de nucleótidos representan los exones y la línea negra la secuencia intrónica. Las flechas señalan el lugar donde se produce el cambio de Guanina (g) por Adenina (a).

El análisis de la mutación c.1042-1G>A mediante el programa “Neural Network” (NN) consistió en la evaluación de 6878 nucleótidos correspondientes al total de nucleótidos del intrón 10 (2476), al total de nucleótidos del exón 11 (96) y al total de nucleótidos del intrón 11 (1760). Si bien el programa reconoce, en el alelo normal, varias zonas de “splicing” con diferentes porcentajes de probabilidad, la secuencia original o correcta presenta un reconocimiento del 92% como sitio de corte y empalme. Según el análisis de este programa en el alelo mutado el cambio de una Guanina (g) por Adenina (a) en posición -1 del intrón 10 del gen PHKA2, generado por la

mutación c.1042-1G>A, ocasionaría la pérdida de reconocimiento del sitio de corte y empalme normal, no figurando la posición en la tabla de puntajes.

EAG-VI. Gen PYGL

En relación a la actividad de la PHK en glóbulos rojos, se obtuvo valores dentro del rango normal para las probandos EV y TP (Tabla VII), estos datos aunados a que ambas son de sexo femenino condujo al estudio molecular en el gen PYGL responsable de la EAG-VI. Cabe destacar que, en la década de 1980, estas dos pacientes fueron caracterizadas nosológicamente de padecer EAG-VI mediante la metodología de aquel momento: biopsia hepática a cielo abierto destinada a la determinación de la actividad fosforilasa, práctica que en la actualidad está en franco desuso. Respecto a los mellizos AJU y AJI, de géneros diferentes, no se les realizó estudio enzimático de PHK en células sanguíneas, abordándose directamente el estudio molecular del gen responsable de la EAG-VI según los pasos propuestos en el algoritmo antes mencionado (Fig. 11).

El análisis de secuencia de nucleótidos en el gen PYGL, responsable de la EAG-VI, realizado en los pacientes EV, TP, AJU y AJI logró detectar cambios en la totalidad de los alelos analizados. Como se mencionó anteriormente, en la Tabla VII se presentan las mutaciones detectadas en los probandos estudiados, especificando el nucleótido alterado por cada mutación y el efecto que dicho cambio ocasiona en la proteína.

Las variaciones génicas detectadas mediante este estudio en los pacientes analizados en nuestro centro con EAG-VI fueron cuatro sustituciones y un polimorfismo: p.Gly233Ser, p.Gly686Arg, p.Met1Lys, p.Glu673Lys y IVS15-2delA. En las Fig. 15 y 16 se presentan los árboles genealógicos de las familias

con estudio del gen PYGL indicándose el genotipo encontrado en cada paciente y familiares disponibles estudiados.



Figura 15. Árboles genealógicos de las pacientes TP y EV en donde se indica el genotipo encontrado en cada una de ellas

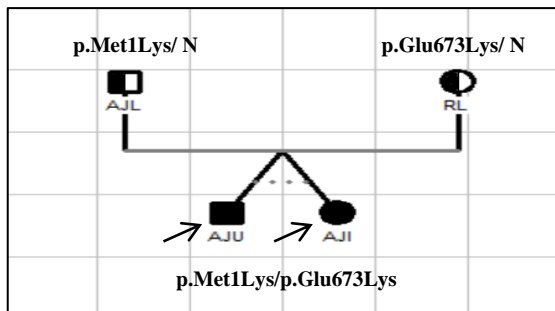


Figura 16. Árbol genealógico de la familia de los pacientes AJU y AJI en donde se indica el genotipo encontrado en ellos y sus progenitores.

N: Alelo normal

En la Fig. 17 se ilustra, en forma parcial, los electroferogramas con las variaciones identificadas en la secuencia de nucleótidos del gen PYGL en los pacientes EV, TP, AJU y AJI.

La mutación p.Gly686Arg, no descrita en la bibliografía foránea, se identificó en un alelo de la paciente TP y en los dos alelos de EV cuyos genotipos resultaron heterocigota compuesto y homocigota respectivamente. La transversión G>A en el nucleótido 2056 del ADNc del gen PYGL se localiza en el exón 17 y es responsable en la proteína de la sustitución del residuo glicina 686 por arginina.

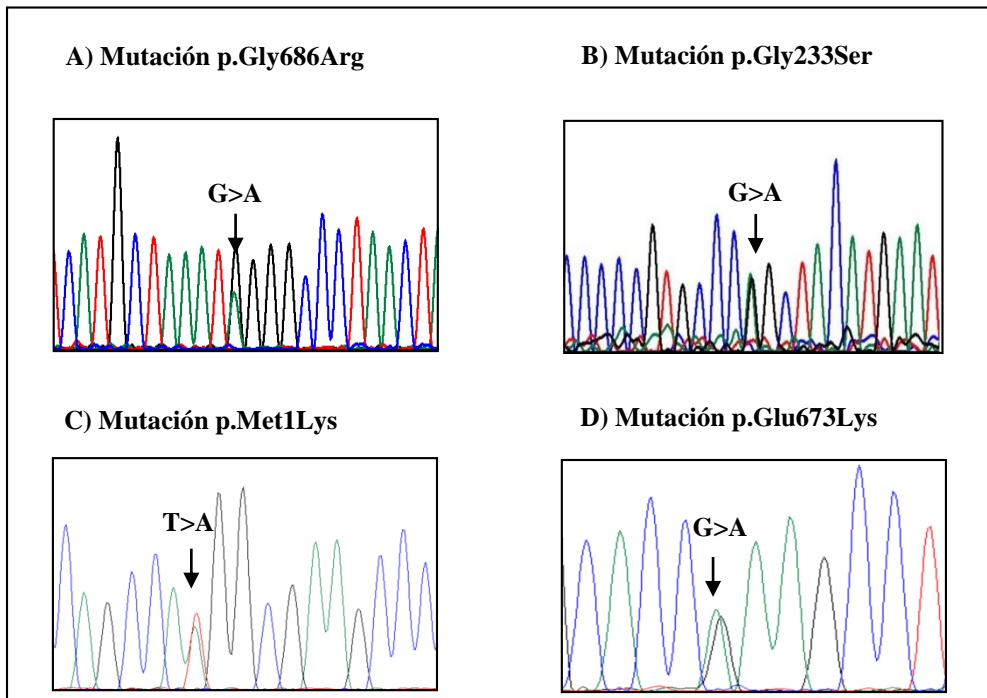


Figura 17. Electroferogramas que muestran: A) el cambio de G>A en el nucleótido 2056 del gen PYGL causante de la mutación p.Gly686Arg. B) la sustitución de G>A en el nucleótido 698, del gen PYGL causante de la mutación p.Gly233Ser. C) sustitución de T>A en el nucleótido 2 del gen PYGL causante de la mutación p.Met1Lys. D) el cambio de G>A en el nucleótido 2017 del gen PYGL causante de la mutación p.Glu673Lys. Las flechas indican las posiciones de los cambios.

Con el propósito de investigar si la glicina 686 es un residuo conservado en distintas especies, se realizó el alineamiento de secuencias de aminoácidos de la enzima glucógeno fosforilasa de siete especies diferentes utilizando el programa ClustalW2. Entre las secuencias analizadas se incluyeron, además de la del hombre (*Homo sapiens*), las del ratón (*Mus musculus*), conejo (*Oryctolagus cuniculus*), zebrafish (*Danio rerio*), rata (*Rattus norvegicus*), gallo (*Gallus gallus*) y perro (*Canis lupus*), pudiéndose observar que ese aminoácido, la glicina 686, se encuentra conservada en todas las especies analizadas (Fig. 18).

		Gly686	
Homo_sapiens	-----GTGNMKFMLN	G	ALTIGTMDGA-----
Mus_musculus	-----GTGNMKFMLN	G	ALTIGTMDGA-----
Oryctolagus_cuniculus	-----GTGNMKFMLN	G	ALTIGTMDGA-----
Danio_rerio	-----GTGNMKFMLN	G	ALTIGTMDGA-----
Rattus_norvegicus	-----GTGNMKFMLN	G	ALTIGTMDGA-----
Gallus_Gallus	-----GTGNMKFMLN	G	ALTIGTMDGA-----
Canis_lupus	-----GTGNMKFMLN	G	ALTIGTMDGA-----

Figura 18. Alineamiento de secuencias de glucógeno fosforilasa de siete especies diferentes en la región del cambio missense nuevo p.Gly686Arg.

Por otra parte y con la intención de predecir el efecto funcional de la mutación inédita p.Gly686Arg, se utilizaron los programas PolyPhen-2 y SIFT detallados en el apartado de metodología. La aplicación del primero de estos recursos bioinformáticos indicó que el cambio del residuo neutro glicina por el aminoácido básico arginina resultaría en una variante proteica probablemente perjudicial, representada por una puntuación máxima de 1.000 (Fig. 19). En relación al segundo programa de computación, SIFT, este predice que el cambio no sería tolerado generando una posible proteína no funcional.

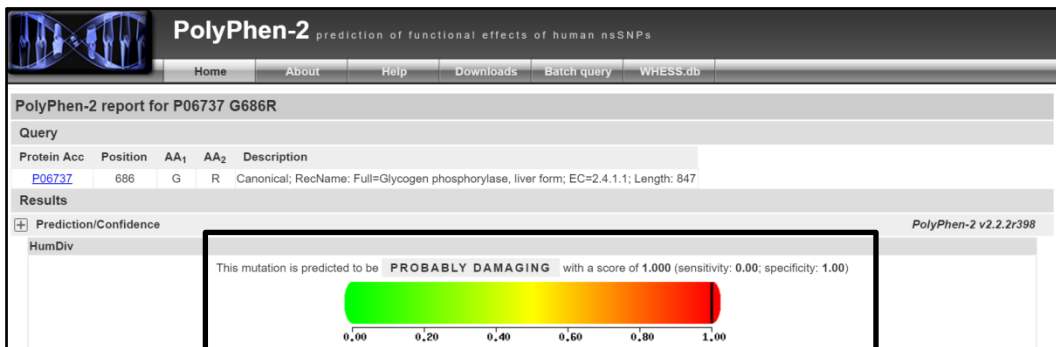


Figura 19. Grafico que indica el resultado obtenido mediante análisis bioinformático con el programa PolyPhen-2 con predicción del daño que produciría la mutación p.Gly686Arg.en la proteína Fosforilasa.

La alteración detectada en el otro alelo de la paciente TP es la mutación p.Gly233Ser. Este cambio missense c.698G>A es producido por la sustitución de G>A en el nucleótido 698 del ADNc del gen PYGL localizado en el exón 6 (Fig.

17B). Resulta en el reemplazo del residuo glicina por serina en la posición 233 de la proteína, y si bien esta alteración génica es inédita, existe en la bibliografía la descripción de una mutación, la p.Gly233Asp, que involucra al mismo codón. Este nuevo cambio hallado en nuestro estudio se analizó por ambos algoritmos computacionales, PolyPhen-2 y SIFT, conduciendo a resultados compatibles con alteración funcional en la glucógeno fosforilasa (Fig. 20).

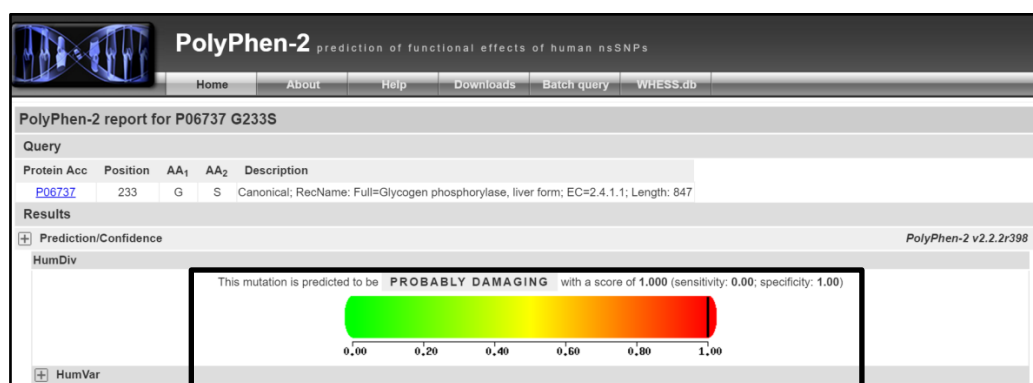


Figura 20. Análisis de la mutación p.Gly233Ser con PolyPhen-2 demostrando una predicción de daño en la proteína de máxima puntuación (1.000).

Continuando con las mutaciones halladas en los pacientes mellizos AJU y AJI, la mutación p.Met1Lys no ha sido descrita previamente por la bibliografía. Este cambio missense c.2T>A es producido por la sustitución de T>A en el nucleótido 2 del ADNc del gen PYGL localizado en el exón 1 (Fig. 17C) que resulta en el reemplazo de metionina por lisina en la posición 1 de la proteína. Esta mutación se corroboró en ambos padres, la cual se encontró en heterocigosis en el padre de los pacientes (Fig. 16). Se ha analizado su efecto en la proteína utilizando los sistemas bioinformáticos Polyphen y SIFT respectivamente (Fig. 21).

Por otro parte, la mutación hallada en el otro alelo de los pacientes AJU y AJI p.Glu673Lys fue descrita anteriormente en la bibliografía por Beauchamp y col. 2007 (<http://www.hgmd.cf.ac.uk>).

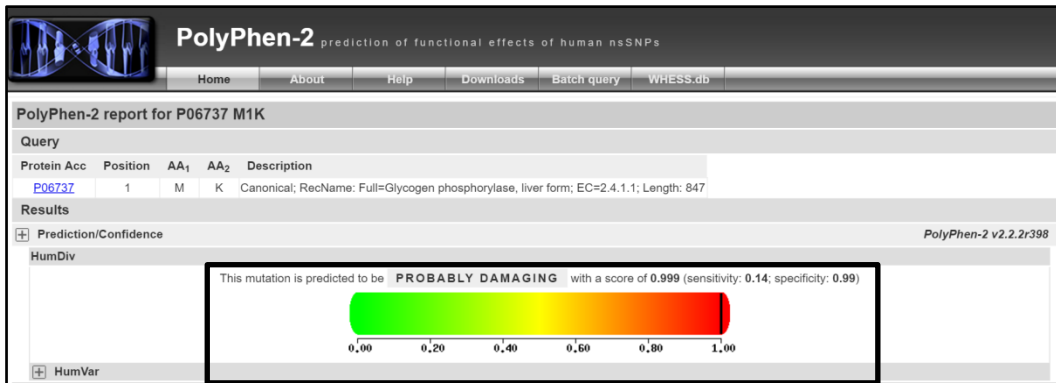


Figura 21. Análisis de la mutación p.Met1Lys con PolyPhen-2 demostrando una predicción de daño en la proteína de puntuación (0.999).

Otro hallazgo identificado a partir del análisis molecular de la EAG-VI, fue la detección del polimorfismo c.1828-2delA producido por la delección de la adenina localizada en posición -2 en la secuencia consenso del sitio aceptor de “splicing” del intrón 15. Este polimorfismo fue descrito por Beauchamp NJ y col⁷ quienes lo identificaron tanto en pacientes como en individuos normales. Estos autores evaluaron in silico el efecto de esta variación intrónica que resultó sólo en una pequeña diferencia en la puntuación asignada entre las dos formas polimórficas: c.1828-2A y c.1828-2delA. En nuestro estudio, el polimorfismo c.1828-2delA estuvo presente en condición de homocigosis en las dos pacientes con EAG-VI, TP y EV.

En los seres vivos la polimerización de la glucosa en glucógeno es un mecanismo esencial para el almacenamiento de energía y en los momentos de necesidad, las células pueden recurrir a la utilización de la glucosa derivada del catabolismo del glucógeno. Por lo tanto, cualquier deficiencia enzimática implicada en la síntesis o degradación de esta macromolécula puede dar lugar a EAG. Las EAG están subclasificadas teniendo en cuenta los defectos enzimáticos a lo largo de la vía del metabolismo de glucógeno. Debido a que el glucógeno se acumula principalmente en el hígado y el músculo, las manifestaciones clínicas están relacionadas con estos tejidos²⁸.

Las EAG-VI y EAG-IXa-c son debidas a la deficiencia funcional del sistema de la fosforilasa hepática y ambas patologías se caracterizan clínicamente por hepatomegalia, y retraso del crecimiento en la primera infancia. En el sistema de la fosforilasa hepática, la enzima PHK, convierte la fosforilasa en una forma activa que desempeña un rol importante para la degradación de glucógeno en glucosa-1-fosfato. Este paso es defectuoso por mutaciones en el gen PYGL causando la EAG-VI y en los genes PHKA2, PHKB y PHKG2 responsables de las EAG-IXa, EAG-IXb y EAG-IXc respectivamente. Todas estas patologías, de origen genético y comprometidas en la degradación de glucógeno son heredadas en forma autosómica recesiva excepto la producida por cambios en el gen PHKA2 que conducen a la glucogenosis ligada al cromosoma X del hígado (EAG-IXa) y es la más frecuente de las EAG-IX hepáticas²⁹.

La selección del tópico de este trabajo de Tesis se focalizo, inicialmente, en forma puntual al diagnóstico molecular de la EAG-IXa pero la experiencia clínica en general y los hallazgos bioquímicos en particular, nos condujo a considerar no solo la EAG-IXa sino también a la EAG-VI. La necesidad de arribar a una definición nosológica exacta en estos pacientes evitando métodos invasivos como las biopsia de hígado, nos estimuló a diseñar una estrategia diagnostica para la investigación de los

defectos en el **sistema de la fosforilasa**; el algoritmo propuesto en el apartado de materiales y métodos nos orienta hacia cual patología abordar primero mediante la consideración del sexo del paciente, actividad de PHK eritrocitaria y el análisis molecular de los genes involucrados (PHKA2 y PYGL).

Diagnóstico de la EAG-IXa (ligada al cromosoma X)

La deficiencia *PHK* en glóbulos rojos detectada en el paciente CK y el hecho que es un paciente de sexo masculino nos condujo a iniciar la investigación de las EAG hepática con el análisis del gen PHKA2 causante de la EAG-IXa ligada al cromosoma X. A esta premisa se sumó el hecho de conocer el vasto antecedente familiar de este paciente: 3 de sus primos hermanos fueron también diagnosticados por determinación enzimática de padecer EAG-IX en la década de 1980. Desafortunadamente, no pudimos acceder al material de todos los probandos involucrados de esta familia para el análisis molecular. Originalmente, se planteó investigar los cambios de este gen a través del estudio molecular a partir de muestras de ADNc. En el proceso de estandarización metodológica, se utilizaron muestras control normal que luego, por medio de la utilización de oligonucleótidos específicos se amplificó por PCR el ADNc del gen PHKA2 para luego ser sometido a secuenciación directa. Esta metodología, luego de numerosos intentos de aplicarla a nuestro paciente CK, no fue posible reproducir la experiencia. Serán necesarias investigaciones adicionales para elucidar la causa de estos resultados dispares, una explicación hipotética de este resultado experimental, como así mismo la resultante de la revisión teórica y bibliográfica, podría deberse a que la cantidad de transcripto generado a partir del gen PHKA2 en nuestro paciente, CK, pueda estar francamente disminuido por la mutación en sitio de corte de empalme identificada. De allí, emergió el cambio en el abordaje del estudio molecular de la EAG-IX ligada al cromosoma X que se realizó a través de la amplificación de los 33 exones y

sus correspondientes uniones exón/intrón del gen PHKA2 y posterior secuenciación de nucleótidos. La aplicación de esta metodología en el paciente CK culminó con el hallazgo inédito de una sustitución G>A en el sitio aceptor de “splicing” del intrón 10 del gen PHKA2 (mutación c.1042-1G>A). Teniendo en cuenta que los sitios de “splicing” constituyen las secuencias consenso claves que determinan las uniones de exones, se propuso aplicar los algoritmos MaxEntScan y Neural Network para predecir la consecuencia de la presencia de la mutación c.1042-1G>A en la maduración del pre-ARNm de PHKA2. Ambos algoritmos predijeron coincidentemente la pérdida de ese sitio de “splicing” frente a la variación génica c.1042-1G>A.

En la actualidad, el análisis molecular ocupa un papel preponderante para definir o descartar la condición de heterocigota en las familias de riesgo, condición difícil de especificar basándose en métodos enzimáticos. La detección del cambio c.1042-1G>A, no sólo permitió confirmar la EAG-IXa en el paciente CK sino también corroborar el estado de portador de su madre y la identificación del estado de heterocigota en una de sus tías maternas. Los desórdenes genéticos ligados al cromosoma X, como la EAG-IXa, generalmente produce sintomatología en varones, aunque ya se han descrito mujeres con sintomatologías por el mecanismo conocido como inactivación del cromosoma X²⁸. Por este motivo la detección de portadoras en las familias es imprescindible para un correcto asesoramiento genético.

Diagnóstico de la EAG-VI

Ante la presencia de un paciente con fenotipo compatible de EAG hepática, la práctica médica asistencial indica realizar una serie de estudios previos, clínicos y bioquímicos, que permitan direccionar la presunción diagnóstica hacia una determinada variante. Como se especificó en la introducción del presente escrito, existen aspectos distintivos en la presentación clínica-bioquímica de las EAG hepáticas en la vía

catabólica del glucógeno que orientan el diagnóstico de laboratorio como por ejemplo la EAG-I por presentar adicionalmente compromiso renal, hiperuricemia e hiperlacticoacidemia o una EAG-III que puede presentar en alguna de sus variantes cardiomiopatía asociada. Sin embargo, no se reconoce ningún signo, síntoma o alteración bioquímica que permita diferenciar entre una EAG-VI y EAG-IX, en particular en la primera y segunda infancia (pre púber), etapa etaria fundamental para el seguimiento y manejo terapéutico, y por ende el correcto asesoramiento genético. En base a esta realidad, surgió la inquietud de ampliar la temática de este trabajo, inicialmente focalizada al estudio molecular de la EAG-IX ligada al cromosoma X (variante más frecuente de las EAG-IX) con la incorporación de la EAG-VI. Nuestra propuesta para encarar el diagnóstico de estas dos patologías fue, como se detallo en la sección de materiales y métodos, a través del diseño de un algoritmo diferencial constituido por pasos secuenciales que dependen del sexo del paciente y la medición de la actividad PHK en glóbulos rojos.

Respecto a nuestros pacientes, en TP y EV, la definición diagnóstica de EAG-VI ya había sido realizada en la década de 1980 en nuestro laboratorio por análisis enzimático en muestras de hígado, metodología aplicada y conocida en ese momento, se volvió a confirmar su diagnóstico por metodología molecular. La aplicación del algoritmo propuesto permitió dirigir el estudio molecular hacia el gen PYGL en los hermanos AJU y AJI teniendo como base signos y síntomas compatibles con posible defecto en el sistema de la fosforilasa hepática además de la orientación primaria del "pedigree": hermanos mellizos de diferente sexo. El análisis del espectro de mutaciones encontradas en el gen PYGL causante de EAG-VI en estos 4 pacientes merece las siguientes observaciones: a) el 100% de los alelos fueron identificados, b) el espectro de variaciones génicas responsables de EAG VI en la población vernácula estuvo

constituido por 3 sustituciones “missense” **no descritas**; una de ellas, p.Gly686Arg, en el exón 17, la segunda variación génica, p.Met1Lys en el exón 1 y la tercera mutación p.Gly233Ser, ubicada en el exón 6. Por último, el cambio p.Glu673Lys, ya descrito en la bibliografía por Beauchamp y col. 2007, completa el espectro de mutaciones detectadas en el gen PYGL de pacientes argentinos. c) estudios in silico de las 3 mutaciones nuevas predicen que afectarían la funcionalidad de la enzima. d) es interesante destacar que la estimación de la frecuencia alélica de todas las variaciones génicas detectadas en el gen PYGL resultó del 50% para p.Gly686Arg que estuvo presente en 3 de los 6 alelos estudiados y del 16,6% para los restantes cambios encontrados en este gen en los pacientes argentinos investigados.

En conclusión, se estima que esta investigación es el inicio en un área de conocimiento previamente no abordado en nuestro país que permitió definir pacientes con EAG VI y EAG IX demostrando que el análisis genético representa un procedimiento útil para establecer un diagnóstico certero. Estos resultados representan para nuestro país, el inicio en la diferenciación de los defectos del sistema de la fosforilasa evitando métodos invasivos de diagnóstico a través de una estrategia de análisis de los genes responsables de estas enfermedades. Estudios moleculares adicionales en una casuística ampliada proveerán una mejor definición de las bases moleculares de la Deficiencia del Sistema de la Fosforilasa en la Argentina.

1. Chen Y. Glycogen storage diseases. In: Sly, WS; Valle D, ed. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. New York; 2001:1521-1551.
2. Santer, Rene; Klepper, Joerg; Smit GPA. Disorders of Carbohydrate Metabolism and Glucose transport. In: Blau N et al, ed. *Physician's Guide to the Diagnosis, Treatment, and Follow-up of Inherited Metabolic Diseases*. ; 2014:265-301.
3. Laforet, Pascal; Weinstein, David A; Smit GP a. The Glycogen Storage Diseases and Related Disorders. In: Sandubray, Jean-Marie; Berghe, Georges Vanden; Walter JH, ed. *Inborn Metabolic Diseases: Diagnosis and Treatment*. 5th ed. ; 2012:129.
4. Bayraktar Y. Glycogen storage diseases: new perspectives. *World J Gastroenterol*. 2007:2541-2553.
5. Roscher A, Patel J, Hewson S, et al. The natural history of glycogen storage disease types VI and IX : Long-term outcome from the largest metabolic center in Canada. *Mol Genet Metab*. 2014:9-14. doi:10.1016/j.ymgme.2014.09.005.
6. Hendrickx J, Dams E, Coucke P, Lee P, Fernandes J, Willems PJ. X-linked liver glycogenosis type II (XLG II) is caused by mutations in PHKA2, the gene encoding the liver alpha subunit of phosphorylase kinase. *Hum Mol Genet*. 1996;5(5):649-652. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8733133>.
7. Beauchamp NJ, Taybert J, Champion MP, et al. High frequency of missense mutations in glycogen storage disease type VI. *J Inherit Metab Dis*. 2007;30(5):722-734. doi:10.1007/s10545-007-0499-9.
8. Davit-Spraul A, Piraud M, Dobbelaere D, et al. Liver glycogen storage diseases due to phosphorylase system deficiencies: diagnosis thanks to non invasive blood enzymatic and molecular studies. *Mol Genet Metab*. 2011;104(1-2):137-143. doi:10.1016/j.ymgme.2011.05.010.

-
9. RJ BW DA. Phosphorylase kinase: the complexity of its regulation is reflected in the complexity of its structure. 1999.
 10. Dasgupta M, Honeycutt T BD. The gamma-subunit of skeletal muscle phosphorylase kinase contains two noncontiguous domains that act in concert to bind calmodulin. *J Biol Chem*. 1989;264:17156-17163.
 11. Davidson JJ, Ozcelik T, Hamacher C, Willems PJ, Francke U KM. cDNA cloning of a liver isoform of the phosphorylase kinase alpha subunit and mapping of the gene to Xp22.2-p22.1, the region of human X-linked liver glycogenosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89:2096-2100.
 12. Francke U, Darras BT, Zander NF KM. Assignment of human genes for phosphorylase kinase subunits alpha (PHKA) to Xq12-q13 and beta (PHKB) to 16q12-q13. *Am J Hum Genet*. 1989;45:276-282.
 13. Hirono H, Shoji Y, Takahashi T, et al. Mutational analyses in four Japanese families with X-linked liver phosphorylase kinase deficiency type 1. *J Inherit Metab Dis*. 1998;21(8):846-852. doi:10.1023/A:1005422819207.
 14. Hendrickx J, Coucke P, Bossuyt P, et al. X-linked liver glycogenosis: localization and isolation of a candidate gene. *Hum Mol Genet*. 1993;2(5).
 15. Hendrickx J, Lee P, Keating JP, et al. Complete genomic structure and mutational spectrum of PHKA2 in patients with x-linked liver glycogenosis type I and II. *Am J Hum Genet*. 1999;64(6):1541-1549. doi:10.1086/302399.
 16. Ban K, Sugiyama K, Goto K, Mizutani F, Togari H. Detection of PHKA2 gene mutation in four Japanese patients with hepatic phosphorylase kinase deficiency. *Tohoku J Exp Med*. 2003;200(1):47-53.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12862311>.
 17. Beauchamp NJ, Dalton A, Ramaswami U, et al. Glycogen storage disease type

-
- IX: High variability in clinical phenotype. *Mol Genet Metab.* 2007;92(1-2):88-99. doi:10.1016/j.ymgme.2007.06.007.
18. Adzhubei IA et al. A. Method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods* 7. 2010:248-249.
 19. Ramensky, V., Bork, P. & Sunyaev S. Human non-synonymous SNPs: server and survey. *Nucleic Acids Res* 30. 2002:3894-3900.
 20. Sunyaev SR et al. PSIC: profile extraction from sequence alignments with position-specific counts of independent observations. *Protein Eng* 12. 1999:387-394.
 21. Kumar, P., Henikoff, S. & Ng PC. Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nature Protocols* 4. *Nat Protoc* 4. 2009:1073-1081.
 22. Ng, P. C. & Henikoff S. Predicting the effects of amino acid substitutions on protein function. , 61–80 (2006). *Annu Rev Genomics Hum Genet* 7. 2006:61-80.
 23. Ng, P. C. & Henikoff S. SIFT: predicting amino acid changes that affect protein function. , 3812–3814 (2003). *Nucleic Acids Res* 31. 2003:3812-3814.
 24. Ng, P. C. & Henikoff S. Accounting for Human Polymorphisms Predicted to Affect Protein Function. *Genome Res* 12. 2002:436-446.
 25. Ng, P. C. & Henikoff S. Predicting deleterious amino acid substitutions. *Genome Res* 11. 2001:863-874.
 26. Yeo, G; Burge CB. Maximum entropy modeling of short sequence motifs with applications to RNA splicing signals. *J Comput Biol a J Comput Mol cell Biol* 11. 2004:377-394.
 27. Reese, M. G., Eeckman, F. H., Kulp, D. & Haussler D. Improved splice site detection in Genie. *J Comput Biol a J Comput Mol cell Biol* 4. 1997:311-323.

28. Cho SY, Lam C wan, Tong SF, Siu WK. X-linked glycogen storage disease IXa manifested in a female carrier due to skewed X chromosome inactivation. *Clin Chim Acta*. 2013. doi:10.1016/j.cca.2013.08.026.
29. Achouitar S, Goldstein JL, Mohamed M, et al. Common mutation in the PHKA2 gene with variable phenotype in patients with liver phosphorylase b kinase deficiency. *Mol Genet Metab*. 2011;104(4):691-694. doi:10.1016/j.ymgme.2011.08.021.