



FACULTAD DE MEDICINA  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA MÉDICA  
Y BIOLOGÍA MOLECULAR



# ENFERMEDAD DE POMPE

## PROTOCOLO DIAGNÓSTICO POR EL LABORATORIO CLÍNICO

TESIS DOCTORAL de  
**JOAQUÍN BOBILLO LOBATO**  
Sevilla 2012

TESIS DOCTORAL



FACULTAD DE MEDICINA  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA MÉDICA  
Y BIOLOGÍA MOLECULAR

# ENFERMEDAD DE POMPE

## PROTOCOLO DIAGNÓSTICO POR EL LABORATORIO CLÍNICO

**JOAQUÍN BOBILLO LOBATO**  
SEVILLA 2012



**Ciencia es el arte de crear ilusiones convenientes,  
que el necio acepta o disputa,  
pero de cuyo ingenio goza el estudioso,  
sin cegarse ante el hecho de que tales ilusiones son  
otros tantos velos para ocultar  
las profundas tinieblas de lo insondable.**

Carl Gustav Jung (1875-1961) Psicólogo y psiquiatra suizo.

A mis padres, mis hermanos, sobrinos y todos mis seres queridos,  
quienes conforman mi familia y son parte de mi vida.



# AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido posible gracias a la inestimable colaboración de muchas personas. En primer lugar quiero agradecer a mi director de tesis, el Dr. Luis M. Jiménez, la oportunidad que me brindó de incorporarme a este proyecto y poner a mi alcance todos los medios y recursos para la realización de esta Tesis. Gracias por transmitirme tu entusiasmo por la investigación, por tu rigor científico, por el constante estímulo que has supuesto para mí, por tu gran profesionalidad. Gracias por compartir tus conocimientos durante la residencia, por tus experiencias, plena dedicación y atención en todo momento durante la realización de este trabajo, pero principalmente por la confianza que mostraste en mí desde el primer día. Gracias por la total libertad de acción que me diste. Gracias por todo Luis.

Quiero dar las gracias a Pilar Durán, por haber sido la primera en aguantarme y por enseñarme a trastejar con las pipetas, los matraces, el peachímetro, los punchers, el sonicador... y todo el material de laboratorio. Gracias por no desesperar ante mi desorden y en tantas ocasiones en las que he llegado “arrasando”. Gracias por tus valiosos consejos, por escucharme y por el apoyo brindado durante la realización de la Tesis. Esto ha sido posible gracias a ti, tú lo sabes, y tengo que agradeceréte.

Gracias a todo el personal facultativo y técnico del Servicio de Bioquímica Clínica del Virgen del Rocío. Tantas veces unos y otros me habéis aconsejado, os habéis preocupado y me habéis apoyado, dándome ánimos para seguir adelante. Especialmente a las Dras. Amelia Zaera y Adela Baños, ambas me disteis el impulso que necesitaba en los momentos en que más lo necesitaba, GRACIAS.

## AGRADECIMIENTOS

Agradecimiento particular merecen todos mis compañeros residentes, a los que no puedo dejar de nombrar: mis co-R's, M<sup>a</sup> Carmen y Carmen(cita); mis R's mayores, Carolina, José Diego, Hada, Said, Nando, Pablo, M<sup>a</sup> José, José Luis y Ana; y mis R's "chicos", Ana, Pedro, Gema, Julia, Beatriz, Lola, Elena, Borja y Antonio. Muchísimas gracias por estar ahí SIEMPRE, por vuestra buena disposición SIEMPRE, por vuestra comprensión SIEMPRE y por vuestra paciencia conmigo SIEMPRE. GRACIAS.

No puedo olvidarme de dar las gracias de forma especial a todos los que, desde fuera del hospital, habéis estado a mi lado y me habéis ayudado tantas veces a huir y a volver: a *huir* de las preocupaciones derivadas del trabajo que tantas veces me sobrepasaba y a *volver* a emprender la tarea con fuerzas renovadas. Siempre he tenido quién me ha escuchado cuando lo he necesitado, quién me ha sacado de casa en las tardes interminables escribiendo, quién me ha dado ideas, quién ha aguantado mis penas, quién me ha ayudado con los cálculos e incluso quién me ha ayudado con la portada... Muchísimas gracias a todos y cada uno.

Y por último, mi agradecimiento, con todo mi cariño, a mi familia. Sin ellos no habría sido posible terminar este proyecto y por eso, además, les dedico esta Tesis. Han sido muchísimas las tardes que, encerrado frente al ordenador, escuchaba el jaleo de la vida que desarrollaba "abajo"; yo me sonreía, aunque no pudiera ir a disfrutar de esos ratitos con vosotros. Todo este trabajo es por vosotros y para vosotros. Con todo mi corazón: GRACIAS.

**Muchas gracias a todos.**





# ÍNDICE



# ÍNDICE

## I. INTRODUCCIÓN

1. Enfermedades raras: Concepto y perspectiva general.....	19
2. Enfermedades Lisosomales: Concepto y perspectiva general.....	21
3. Glucogenosis: Concepto y perspectiva general.....	26
4. Enfermedad de Pompe.....	28
4.1. Concepto y definición.....	28
4.2. Historia.....	28
4.3. Formas de presentación de la enfermedad de Pompe.....	30
4.4. Prevalencia.....	31
4.5. Bases moleculares, citológicas y fisiopatológicas de la enfermedad de Pompe.....	33
4.5.1. Genética de la enfermedad de Pompe.....	33
4.5.2. Síntesis y maduración de la $\alpha$ -glucosidasa ácida.....	37
4.5.3. Fundamentos del daño citológico.....	44
4.5.3.1. Tipos de Fibras musculares.....	44
4.5.3.2. Citopatología de la Enfermedad de Pompe.....	47
4.5.4. Fisiopatología de la enfermedad de Pompe. Sintomatología y Evolución de la enfermedad.....	56
4.6. Diagnóstico de la enfermedad de Pompe.....	65
4.6.1. Evaluación clínica.....	67
4.6.2. Evaluación por el laboratorio.....	70
4.7. Tratamiento de la enfermedad de Pompe.....	74
4.7.1. Tratamiento de sustitución enzimática.....	74
4.7.2. Nutrición y Terapia de ejercicio.....	81
4.7.3. Tratamiento por Terapia génica.....	83
4.7.4. Terapia de mejora enzimática: Chaperonas.....	86
4.7.5. Seguimiento del tratamiento de la enfermedad de Pompe.....	88
4.7.6. Perspectivas futuras.....	89

## II. OBJETIVOS

OBJETIVOS .....	93
-----------------	----

## III. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Pacientes .....	97
2. Determinación de actividad $\alpha$ -glucosidasa en sangre seca recogida sobre papel .....	98
2.1. Toma de muestras .....	98
2.2. Reactivos .....	100
2.3. Reacción .....	102
2.4. Proceso de lectura en microplacas .....	103
2.5. Cálculos .....	103
2.6. Informe de los resultados .....	105
2.7. Control de calidad de las muestras de sangre seca .....	106
3. Determinación de actividad $\alpha$ -glucosidasa intralinfocitaria .....	107
3.1. Toma y preparación de muestras .....	107
3.2. Reactivos .....	108
3.3. Reacción .....	110
3.4. Proceso de lectura en microplacas .....	111
3.5. Determinación de proteínas intralinfocitarias .....	111
3.6. Cálculos .....	112
3.7. Informe de los resultados .....	113
4. Determinación de los niveles de glucosa tetrasacárido en orina .....	114
4.1. Materiales e instrumentación .....	114
4.2. Toma y preparación de muestras .....	115
4.3. Análisis y cuantificación mediante HPLC .....	116
4.4. Informe de los resultados .....	117
5. Estudio molecular para la mutación IVS1-13T>G .....	118
5.1. Aislamiento del ADN .....	118
5.2. Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real e identificación de la mutación IVS1-13T>G .....	120

**IV. RESULTADOS**

1. Resultados de la revisión bibliográfica.....	127
2. Resultados de actividad $\alpha$ -glucosidasa en sangre seca recogida sobre papel para el diagnóstico de la enfermedad de Pompe.....	128
2.1. Resultados de actividad en la población estudiada.....	128
2.2. Estudio de la veracidad mediante la participación en programas externos de calidad.....	132
3. Resultados de actividad $\alpha$ -glucosidasa intralinfocitaria para el diagnóstico de la enfermedad de Pompe.....	135
4. Determinación de glucosa tetrasacárido como biomarcador diagnóstico de la enfermedad de Pompe.....	138
4.1. Resultados de la cuantificación en la población estudiada.....	138
4.2. Construcción de una curva ROC para evaluar la importancia de la glucosa tetrasacárido como biomarcador diagnóstico.....	141
5. Contribución del estudio molecular al diagnóstico definitivo.....	144
6. Estudio coste/efectividad.....	146
7. Población de pacientes diagnosticados según nuestro protocolo diagnóstico.....	148

**V. DISCUSIÓN**

DISCUSIÓN.....	157
----------------	-----

**VI. CONCLUSIONES**

CONCLUSIONES.....	173
-------------------	-----

**VII. ANEXOS**

ANEXO I.....	179
ANEXO II.....	185
ANEXO III.....	195
ANEXO IV.....	197
ANEXO V.....	199

**VIII. BIBLIOGRAFÍA**

BIBLIOGRAFÍA.....	205
-------------------	-----



**ABREVIATURAS MÁS UTILIZADAS DURANTE LA TESIS**

4MU	⇒	4-Metilumbeliferona
AαG	⇒	Actividad α-glucosidasa ácida total
AαGIM	⇒	Actividad α-glucosidasa inhibida por acarbosa
CDC	⇒	Centro de control y prevención de enfermedades de Atlanta (Centers for Disease Control and Prevention)
CHO	⇒	Células ováricas de Hámster chino
CK	⇒	Creatin-quinasa
DBS	⇒	Sangre seca recogida sobre papel (Dried Blood Specimen/Spot)
EDL	⇒	Enfermedad de depósito lisosomal
EET	⇒	Terapia de mejora enzimática (Enzyme Enhancement Therapy )
EP	⇒	Enfermedad de Pompe
ER	⇒	Enfermedad rara
GAA	⇒	Enzima α-glucosidasa ácida
Glc4	⇒	Glucosa tetrasacárido
GSD	⇒	Glucogenosis/Enfermedad de depósito de glucógeno (Glycogen Storage Disease)
HPLC	⇒	Cromatografía líquida de alta resolución (High Performance Liquid Chromatography)
IVS1-13T>G	⇒	Mutación más prevalente en la forma del adulto. Transversión de Timina por Guanina en la posición -13 del intrón 1 del gen <i>GAA</i>
M6P	⇒	Manosa-6-fosfato

## ABREVIATURAS

M6RP	⇒	Receptor de la manosa-6-fosfato
MGA	⇒	Maltasa glucoamilasa
NTE	⇒	Nutrición y Terapia del ejercicio
N $\alpha$ G	⇒	Actividad $\alpha$ -glucosidasa ácida neutra
PCR	⇒	Reacción en cadena de la polimerasa
rhGAA	⇒	Enzima $\alpha$ -glucosidasa ácida humana recombinante
TSE	⇒	Terapia de sustitución enzimática
URV	⇒	Unidad relativa de valor





# **INTRODUCCIÓN**



# I. INTRODUCCIÓN

## 1. Enfermedades raras: Concepto y perspectiva general

En la década de los años 60 aparecen en Europa las primeras referencias bibliográficas en torno al concepto de enfermedad rara (ER)<sup>1</sup>; pero no es hasta 1983 cuando se constituye en los Estados Unidos de Norteamérica la NORD (National Organization for Rare Disorders), acuñándose de forma oficial el término de Enfermedad Rara, haciendo referencia a enfermedades con baja prevalencia. Posteriormente en los años 90 se constituye EURORDIS (European Organization for Rare Disorders), federación europea homóloga a la americana, y más recientemente FEDER (Federación Española de Enfermedades Raras) en nuestro país, con el fin de dar respuesta a las asociaciones de enfermos con estas patologías que poco a poco han ido proliferando a lo largo de estos años<sup>2</sup>.

La Unión Europea define ER como aquella que tiene una prevalencia inferior a 5 casos por cada 10.000 habitantes, lo que equivale al 6-8% de la población europea<sup>3</sup>. Este umbral de prevalencia varía según los distintos países atendiendo a criterios epidemiológicos y económicos. En los EE. UU. se considera ER aquella que afecta a menos de 200.000 habitantes<sup>4</sup>, lo que se corresponde con un 8,4% de la población, en Japón las patologías que afectan a 4 de cada 10.000 habitantes<sup>5</sup> y, en Australia, a las que afectan a 1 de cada 10.000<sup>6</sup>. Pero la realidad que se pretende abarcar con el término ER requiere una definición más amplia.

De este modo, una definición más completa de ER sería “*aquel conjunto amplio y variado de trastornos que se caracterizan por afectar, cada uno de ellos, a un número reducido de individuos en la población, ser crónicos y discapacitantes, contar con una elevada tasa de morbimortalidad, y para los que los recursos terapéuticos son, en general, escasos y poco eficaces*”<sup>7</sup>.

Algunas cuestiones importantes que reclaman aquellos que padecen estos trastornos, y quienes están relacionados con ellos, son: la falta de conocimiento científico sobre sus enfermedades; la dificultad para el acceso a un diagnóstico correcto y el retraso en dicho diagnóstico, así como la falta de información de calidad y de apoyo en ese momento; la falta de cuidados y atención multidisciplinaria; las consecuencias sociales adversas; la dificultad y la falta de equidad en el acceso al tratamiento, la rehabilitación y los cuidados; la pérdida de confianza en los servicios médicos y sociales; y cierto desinterés por parte de los profesionales de la salud.

Como hemos referido, el diagnóstico suele ser complicado, no sólo por la sintomatología insidiosa e inespecífica que presentan de forma habitual y que puede llevar a retraso y errores, sino porque muchas veces, las técnicas que requieren son muy costosas y de difícil acceso y, sobre todo, por el gran desconocimiento que los clínicos tienen sobre este tipo de patologías.

En España, la investigación en este campo es todavía escasa<sup>8-11</sup>, y por ello, se hacen necesarios esfuerzos importantes encaminados al desarrollo y potenciación de la investigación en este campo. En este sentido, se ha creado recientemente el Instituto de Investigaciones de Enfermedades Raras (Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Sanidad y Consumo) que, entre otras actividades, ha publicado una Guía-Manual con un enfoque práctico de las ER<sup>12</sup>.

El principal problema con el que nos encontramos es la repercusión sociosanitaria que suponen estas enfermedades<sup>13-14</sup>. La falta de inversiones y la escasa sensibilización de las distintas áreas implicadas, hacen sentir desamparados e impotentes a los pacientes afectados de ER. El escaso número de afectados por una misma ER es insuficiente para impulsar nuevas formas de detección, tratamiento y prevención, lo que agrava todavía más el problema para los pacientes. En los últimos años, la Unión Europea está impulsando la investigación, la formación de profesionales, el conocimiento y la divulgación de estas enfermedades. La solución es compleja, y precisa la colaboración conjunta de instituciones públicas, investigadores, facultativos, empresas farmacéuticas y asociaciones de pacientes<sup>15</sup>.

Dentro de este amplio campo de las ER se encuentran enclavadas las enfermedades por depósito lisosomal, grupo muy heterogéneo donde destaca la enfermedad de Pompe, objeto de estudio del presente trabajo.

La *Decisión N° 1295/1999/CE del Parlamento Europeo y del Consejo del 29 de abril de 1999* aprobó un programa de acción comunitaria sobre las enfermedades poco comunes en el marco de acción en el ámbito de la Salud Pública (1999-2003). Su propósito fue el de contribuir, en coordinación con otras medidas Comunitarias, a asegurar un alto nivel de protección sanitaria con relación a enfermedades raras. Se puso una atención específica en mejorar los conocimientos y en facilitar el acceso a la información sobre estas enfermedades, mediante cuatro acciones, siendo la segunda de ellas: *Contribuir a la formación y la actualización de los conocimientos de los profesionales para mejorar, en el ámbito de las enfermedades poco comunes, la detección precoz, el reconocimiento, la intervención y la prevención*. Por ello, el primer objetivo de esta tesis será contribuir a esta actualización de conocimientos sobre la enfermedad de Pompe a través de una extensa revisión bibliográfica que presente los principales puntos de conocimiento sobre el contexto, diagnóstico y tratamiento de la enfermedad y que quedarán expuestos en el punto I. *Introducción*.

## 2. Enfermedades Lisosomales: Concepto y perspectiva general

La OMS estima que existen actualmente unas 5.000 ER o de baja prevalencia en el mundo<sup>16</sup>. Entre ellas destaca un grupo cada vez más conocido y estudiado: las enfermedades de depósito lisosomal (EDL) o, simplemente, enfermedades lisosomales. De hecho, consideradas una por una, las EDL son poco frecuentes, pero su incidencia combinada puede suponer hasta 1 de cada 5.000-7.000 recién nacidos vivos<sup>17,18</sup>.

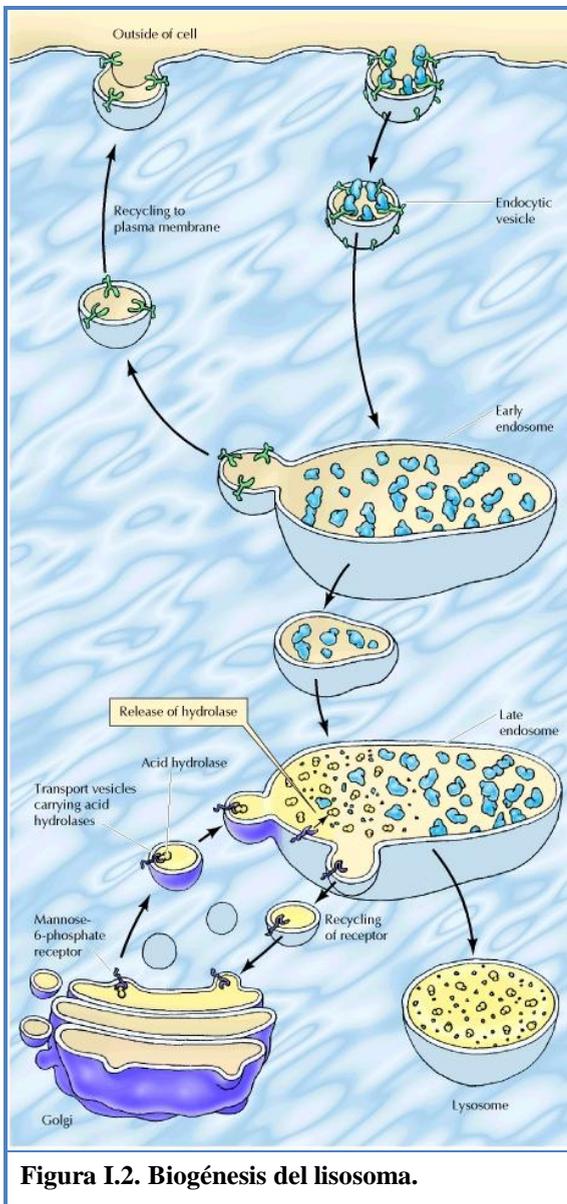
Estas enfermedades tienen su origen en un trastorno, genéticamente determinado, de la síntesis o función de una hidrolasa ácida lisosomal o bien de una proteína necesaria para la correcta biogénesis y/o el normal funcionamiento de los lisosomas. En la actualidad suponen un heterogéneo grupo de alrededor de 50 entidades clínicas para las que hasta hace poco el diagnóstico preciso no era sencillo y requería de técnicas complejas e invasivas. La fisiopatología de la mayoría de estos trastornos se caracteriza por un curso progresivo, con importante morbimortalidad. En la actualidad, sólo se dispone de tratamiento específico para una pequeña parte de estas alteraciones<sup>19-22</sup>.

La mayoría de las enfermedades que hoy se conocen como EDL se describieron por primera vez entre finales del siglo XIX y principios del siglo XX, mucho antes del descubrimiento de los lisosomas por De Duve en 1955<sup>23</sup>. De hecho, la relación que existe entre los lisosomas y las EDL fue establecida por Hers cuando demostró que el déficit de la enzima maltasa ácida ( $\alpha$ -glucosidasa) provocaba la acumulación de glucógeno en el interior de los lisosomas, en los pacientes que padecían la enfermedad de Pompe (Glucogenosis Tipo II)<sup>24-26</sup>. Así, a medida que la estructura y función de este orgánulo celular se define y se identifican las diferentes enzimas en él incluidas, el concepto de EDL evoluciona. Desde este momento, cada enfermedad comienza a estar relacionada con una enzima lisosomal específica, el factor, el receptor o el sustrato acumulado (Figura I.1).

Durante las dos últimas décadas, las técnicas de biología molecular han permitido identificar la mutación o mutaciones específicas que dan lugar a la enfermedad concreta de que se trate. La lista de EDL continúa creciendo a medida que se identifican nuevos trastornos o se descubre qué entidades clínicas de causa hasta ahora desconocida son el resultado de un defecto lisosomal (por ejemplo, recientemente, la enfermedad de Batten).



Los lisosomas son orgánulos intracitoplasmáticos que forman parte de un complejo sistema de endocitosis celular mediada por receptores, utilizado por muchas células para internalizar diversas moléculas procedentes del medio extracelular, de células vecinas o secretadas por ellas mismas. Este sistema está formado por un grupo de estructuras especializadas en la separación de la molécula internalizada de su receptor, en su degradación enzimática y en el almacenamiento del material indigerible. Se trata de los endosomas “primarios”, los endosomas “tardíos”, los lisosomas propiamente dichos y las glicoproteínas asociadas a la membrana (LAMP’s o Igps)<sup>27-29</sup> (Figura I.2).

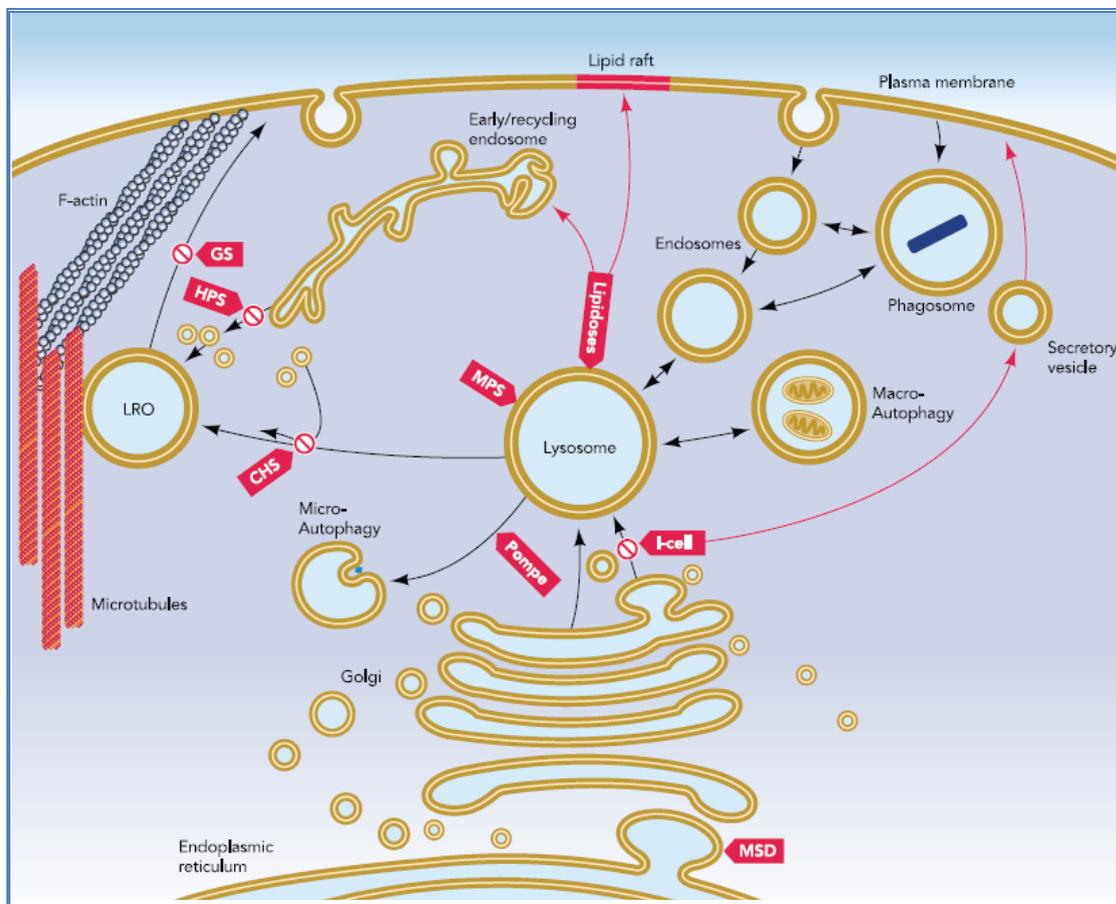


surge como respuesta a esta agresión (reacciones inflamatorias, alteraciones autoinmunes, activación de los sistemas de apoptosis, etc.) se desencadena un proceso fisiopatológico sistémico que puede estar centrado en determinados órganos y/o tejidos o constituir un trastorno que implica a todo el organismo<sup>32</sup>. Por todo ello, las EDL deben ser consideradas tanto alteraciones por “deficiencia” como trastornos de “acúmulo”.

De esta forma se pone de manifiesto cómo el buen funcionamiento lisosomal es fundamental para el adecuado mantenimiento de la homeostasis celular y sistémica.

De entre todo este sistema, los lisosomas son vesículas esféricas rodeadas de una membrana, compuesta por lípidos y proteínas glicosiladas, que protege al resto de la célula de la acción de sus enzimas (hidrolasas) capaces de digerir polisacáridos, proteínas, sulfatos, fosfatos y lípidos. Además, en este sistema únicamente los lisosomas se identifican por ser LAMP positivos<sup>30</sup>.

La sucesión de acontecimientos que marca la fisiopatología de estas enfermedades está basada en la denominada “hipótesis citotóxica”<sup>31</sup>. El trastorno lisosomal origina el acúmulo intracelular de una molécula compleja que la célula es incapaz de degradar y que, de un modo progresivo, altera la morfología y función celular. A través de los efectos propios del error congénito del metabolismo lisosomal (como son el fallo progresivo de todo el sistema endosomal-lisosomal, las alteraciones morfológicas de la estructura celular debido a la presencia de los acúmulos de material no degradable, el déficit de productos esenciales debido a la interrupción de la ruta metabólica, la citotoxicidad que produce la activación de rutas alternativas, etc.) así como la respuesta intercelular que



**Figura I. 3. Citopatología de diferentes enfermedades lisosomales.** Se representan la enfermedad de Pompe, la Enfermedad de las Células I, la Mucopolisacaridosis (MPS), la Esfingolipidosis (lipidosis), los Síndromes hereditarios de Albinismo de Chediak-Higashi (CHS), de Hermansky-Pudlak (HPS), y Griscelli (GS), y la Deficiencia de Sulfatasa Múltiple (MSD). LRO se refiere a los orgánulos relacionados con los lisosomas<sup>20</sup>.

Es importante tener en cuenta que, aunque la anomalía enzimática, determinada genéticamente, se produce en todas las células del organismo, son los tejidos que metabolizan los diferentes sustratos los que principalmente manifiestan esta deficiencia, siendo así que en las diferentes EDL existen tejidos concretos “protagonistas” de la sintomatología propia de la enfermedad.

Es común agrupar las EDL según el déficit enzimático que las ocasiona, debido a que de esta forma la comprensión de la fisiopatología resulta más sencilla y se puede alcanzar un mejor desarrollo de las terapias para enfermedades específicas<sup>33</sup>.

Pero de forma clásica se ha preferido clasificarlas según el tipo de material que se acumula (por ejemplo: esfingolipidosis, mucopolisacaridosis, glucoproteinosis, etc.), ya

que de este modo, se llega a una mejor determinación de los trastornos que pueden estar causados por más de un defecto enzimático (por ejemplo, Mucopolisacaridosis Tipo IV o Mucopolisacaridosis Tipo VII en las que confluyen 2 y 4 déficits enzimáticos respectivamente). Así, el posterior reconocimiento del defecto enzimático y la mutación génica responsable se alcanza de forma más eficiente<sup>34</sup>.

La clasificación basada en las manifestaciones clínicas no es recomendable ya que patologías que se presentan bajo formas sintomatológicas similares puede tener una base totalmente diferente<sup>35</sup>.

En este sentido, la enfermedad de Pompe queda englobada dentro del grupo de las glucogenosis, ya que el producto que se acumula, al no poder degradarse, es el glucógeno. La enfermedad de Pompe se denomina igualmente Glucogenosis tipo II.

### 3. Glucogenosis: Concepto y perspectiva general

Las glucogenosis o enfermedades por almacenamiento de glucógeno (“Glycogen Storage Disease”, GSD) son un grupo heterogéneo de trastornos hereditarios del metabolismo de los hidratos de carbono, y más concretamente del glucógeno, pudiendo éste estar aumentado o presentar una estructura anómala<sup>36</sup>.

El glucógeno es un polímero de cadena ramificada de glucosa y constituye la principal fuente dinámica de almacenamiento de glucosa en músculo e hígado. El problema surge cuando en los tejidos, el glucógeno queda recluso en el interior de las células debido a deficiencias enzimáticas que hacen fracasar la vía glucogenolítica/glucolítica, o cuando existen problemas en su formación, de forma que no puede llegar a sintetizarse el polímero o éste presenta una estructura deficiente<sup>37</sup> (Figura I.4). En general, las GSD se pueden clasificar en tres grupos en relación a estas dos áreas de almacenamiento principal y atendiendo a la expresión clínica y los hallazgos histopatológicos: Hepáticas, Musculares y Generalizadas (con manifestaciones hepáticas, musculares y cardíacas)<sup>38,39</sup>.

En la mayoría de las GSD las manifestaciones clínicas se consideran, esencialmente, expresión de la dificultad que existe en estos tejidos para movilizar sus depósitos de glucógeno. Así, en las GSD hepáticas aparece hepatomegalia, hipoglucemia en los periodos entre comidas y un crecimiento disminuido. Cuando se trata de una GSD muscular puede aparecer debilidad muscular, fatigabilidad en situaciones de ejercicio e incluso dolor muscular y contracturas si el ejercicio es rápido y/o intenso.

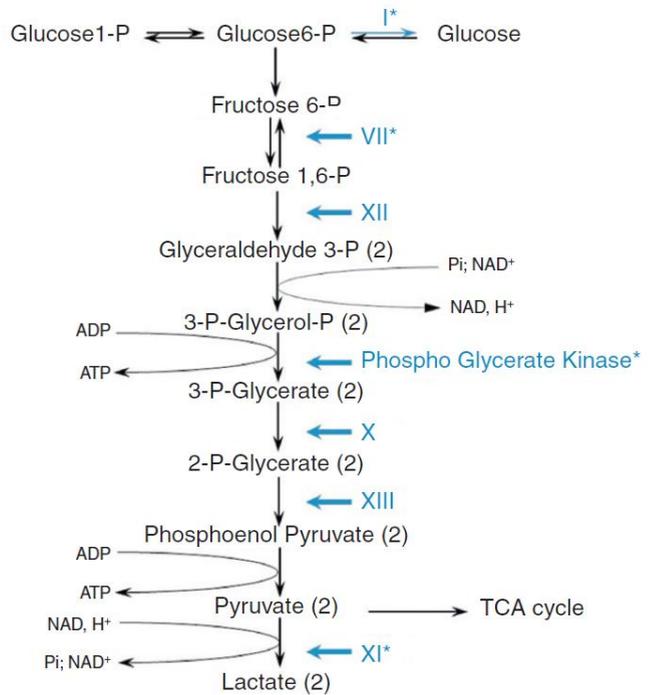
A partir del descubrimiento de la primera glucogenosis por Gerty y Carl Cori en 1952<sup>40</sup>, se fueron identificando y añadiendo a este grupo de patologías otras enfermedades de depósito de glucógeno como consecuencia de la deficiencia de diferentes actividades enzimáticas. Cori propuso entonces una clasificación numérica, según un orden cronológico, que fue bien acogida por la comunidad científica<sup>37, 41, 42</sup> (Figura I.4).

En la GSD Tipo II o enfermedad de Pompe la enzima deficiente es la  $\alpha$ -glucosidasa ácida (EC 3.2.1.20) o maltasa ácida. Ésta es una enzima que actúa a nivel lisosomal lo que convierte a la enfermedad de Pompe en la única glucogenosis que es también una enfermedad lisosomal (Figura I.4)<sup>37</sup>.

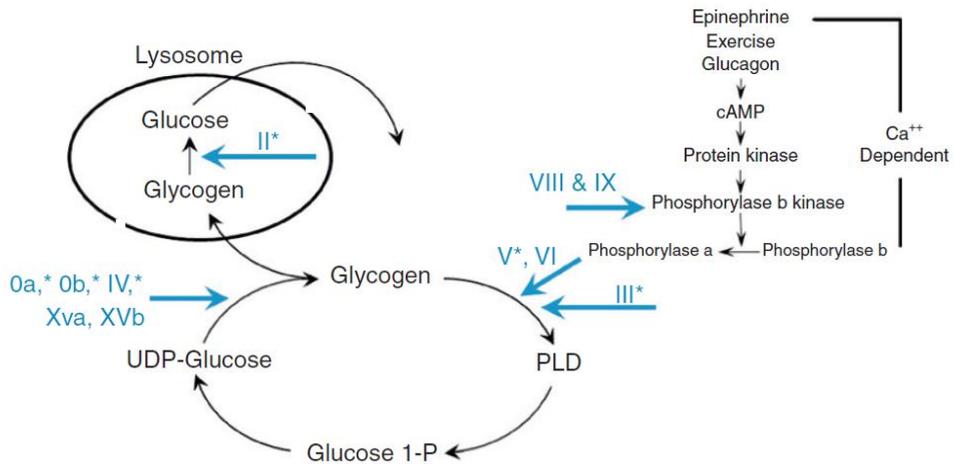
**Figura I.4.**  
**Esquema de la glucólisis y del metabolismo del glucógeno.**

El bloqueo en determinados puntos de la ruta da lugar a los distintos tipos de glucogenosis (números romanos: I - XI). La enfermedad de Pompe o Glucogenosis Tipo II es la única en la que el defecto enzimático se produce a nivel lisosomal.

**a) Glucólisis**



**b) Síntesis y degradación del glucógeno**



## 4. Enfermedad de Pompe

### 4.1. Concepto y definición

La enfermedad de Pompe (EP) o Glucogenosis Tipo II (GSD-II) es, atendiendo a su prevalencia, una enfermedad rara, una enfermedad lisosomal por su citopatología y una glucogenosis según el bloqueo metabólico producido.

Históricamente, la EP es la primera EDL descrita y reconocida como tal, además de ser la única glucogenosis que es también una enfermedad lisosomal. Debido a la presencia de debilidad e hipotonía, también ha sido clasificada como una enfermedad neuromuscular o miopatía metabólica<sup>43</sup>.

El origen de la EP es la deficiencia de la enzima lisosomal que degrada el polímero de glucógeno, la  $\alpha$ -Glucosidasa ácida (GAA; EC 3.2.1.20). La acumulación lisosomal y citoplasmática resultante origina una interrupción de la citoarquitectura y función de las células/tejidos afectados (principalmente músculo esquelético, cardíaco y liso), lo que conduce a una debilidad muscular clínicamente progresiva y debilitante, al desarrollo de una enfermedad multisistémica y, a menudo, a una muerte temprana.

La EP es un trastorno que se manifiesta como un espectro clínico que varía con respecto a la edad de inicio, la tasa de progresión de la enfermedad, y el grado de afectación de los órganos; y en general, existe una correlación inversa entre la severidad de la enfermedad y el nivel de actividad enzimática residual.

### 4.2. Historia

Joannes Casiano Pompe nació en Utrecht el 9 de septiembre de 1901. Estudió medicina en la Universidad de su ciudad natal, y en este periodo fue cuando encontró a un paciente con los síntomas de lo que hoy conocemos como la “Enfermedad de Pompe infantil”, que posteriormente describió en su publicación “*Concerning idiopathic hypertrophy of the heart*” en 1932<sup>44</sup> (*Over idiopathische hypertrophie van het hart*, título original en holandés).

Fue el 27 de diciembre de 1930, cuando el todavía estudiante JC Pompe lleva a cabo la autopsia de una niña de 7 meses que supuestamente había muerto de neumonía.

Lo que encontró fue una importante cardiomegalia, signo característico de la forma infantil de la enfermedad.

Tomando muestras del tejido cardíaco y realizando diferentes preparaciones microscópicas, pudo observar que las alteraciones de las células musculares podían deberse al acúmulo de una sustancia en el interior celular que parecía deformar las fibras cardíacas.



**Figura I.5. J.C. Pompe**

Otros investigadores contemporáneos de Pompe, el Dr. Simon Van Creveld y el Dr. Edgar Von Gierke habían descrito entre 1928 y 1929 la GSD-I, o Enfermedad de Von Gierke, identificando como glucógeno el compuesto acumulado causante del trastorno. La influencia de estos autores llevó a Pompe a sospechar que la sustancia que ocasionaba la alteración cardíaca podía ser efectivamente glucógeno.

Pompe se doctoró en 1936 con una tesis que precisamente titulaba como “*Cardiomegalia glucogénica*”. Después de una temporada en el Hospital San Canisio en Nimega, trabajó como patólogo en el Hospital de Nuestra Señora, en Amsterdam, donde permaneció desde junio de 1939 hasta su muerte<sup>45</sup>.

Posteriormente se define la deficiencia enzimática causante de la enfermedad, la deficiencia de GAA, por el Dr. H. G. Hers en su artículo “*Alpha-glucosidase deficiency in generalized glycogen storage disease (Pompe’s disease)*” de 1963<sup>24,25</sup>. Es en este momento cuando se sientan las bases para el desarrollo de toda una serie de estudios e investigaciones sobre un nuevo grupo de enfermedades, las *enfermedades de depósito lisosomal*<sup>46-50</sup>.

### 4.3. Formas de presentación de la enfermedad de Pompe

La gran variabilidad fenotípica ha llevado a la creación de variedades basadas en la edad de aparición y el grado de afectación de los distintos órganos. Estos “subtipos” han recibido diferentes denominaciones en la literatura: “*forma infantil no típica*”, “*forma juvenil*”, “*forma del adulto*”, “*formas de aparición tardía*”... terminología que supone en muchas ocasiones controversias, incompatibilidades e incongruencias; de forma que, en la actualidad, tiende a considerarse a la EP como una enfermedad de progresión continua que varía según el momento en que debuta, el nivel de implicación de los órganos afectados y el grado de miopatía<sup>51,52</sup>. De este modo, en un intento de establecer una nomenclatura uniforme, podemos clasificar a la EP en dos principales formas de presentación:

**a) Una forma infantil, que incluye:**

- Pacientes que presentan enfermedad rápidamente progresiva caracterizada por una cardiomegalia importante, hepatomegalia, debilidad e hipotonía muscular, y muerte por insuficiencia cardiorrespiratoria durante el primer año de vida<sup>53,54</sup>. Representa a la forma más extrema y grave de la enfermedad y es denominada a menudo como enfermedad de Pompe infantil clásica (precisamente la descrita por J.C.Pompe en 1932)<sup>44</sup>.

- Pacientes con variedad infantil (EP infantil no clásica), con una progresión más lenta y menor miocardiopatía severa, pero con presentación en el primer año de vida. Ésta también ha sido incluida por algunos autores en alguna de las “formas infantiles”<sup>55</sup>.

**b) Una forma de aparición tardía, que incluye:**

- Pacientes en edad infantil o juvenil, con un espectro heterogéneo de patologías musculares, pero que de forma general no incluyen miocardiopatía severa<sup>56,57</sup>.

- Pacientes cuya sintomatología aparece más tarde, entre la segunda y sexta década de la vida (EP del adulto) y caracterizados por una miopatía lentamente progresiva sobre todo con participación del músculo esquelético<sup>58,59</sup>.

Sin embargo, es importante reconocer que la edad de inicio no siempre delimita bien los distintos subtipos, de modo que la presentación clínica debe ser considerada junto con la edad de inicio en la clasificación de los casos.

#### 4.4. Prevalencia

Resulta bastante complejo hablar de prevalencia de la EP y más complejo aún fijar un valor que la defina. La cuestión es que la prevalencia combinada de todas las formas de la enfermedad de Pompe es muy variable y depende enormemente de la etnia y la región geográfica de que se trate; así puede oscilar entre los 1:14.000 recién nacidos vivos en la población afroamericana<sup>60</sup> a los 1:100.000 en individuos de origen europeo<sup>63</sup>.

La única forma de aproximación posible a alcanzar una visión global resulta de analizar cada uno de los estudios individuales sobre prevalencia del trastorno en las distintas poblaciones y a partir de ellos sacar conclusiones.

Sin embargo, este método también ha de hacerse con precaución si pretendemos extraer una información fidedigna, ya que el modo de acercamiento de cada estudio es muy diferente: desde trabajos basados en la cuantificación de casos tomando como base programas piloto de screening neonatal, hasta otros que calculan la prevalencia a partir de estudios poblacionales de frecuencia de las principales mutaciones de la enfermedad (Tabla I.1).

**Tabla I.1. Prevalencia de la enfermedad de Pompe en diferentes poblaciones**

POBLACIÓN	INCIDENCIA	REFERENCIA
Afroamericano	1/14.000	Hirschhorn y Reuser <sup>60</sup>
Países Bajos	1/40.000 (combinada)	Ausems et al <sup>61</sup> Poorthuis et al <sup>62</sup>
	1/138.000 (forma infantil)	
	1/57.000 (forma del adulto)	
EE.UU.	1/40.000 (combinada)	Martiniuk et al <sup>63</sup>
Sur de China / Taiwán	1/50.000	Lin et al <sup>64</sup> Chien et al <sup>65</sup>
Descendientes de europeos	1/100.000 (forma infantil)	Martiniuk et al <sup>63</sup>
	1/60.000 (forma del adulto)	
Australia	1/145.000	Meikle et al <sup>66</sup>
Portugal	1/600.000	Pinto et al <sup>67</sup>

A pesar de estas dificultades para establecer un valor concreto de prevalencia, *Orphanet* (el portal de información europeo de referencia en enfermedades raras y medicamentos huérfanos) ha cuantificado en 1,1/100.000 la prevalencia de la enfermedad en sus informes periódicos de prevalencia de las enfermedades raras<sup>68</sup> basados en los datos bibliográficos publicados recientemente.

Además, y en relación a este tema, resulta muy interesante señalar que el estudio de prevalencia de las mutaciones han permitido detectar lo que en genética se conoce como *efecto fundador* en poblaciones de Taiwán y China (mutación p.Asp645Glu – 80% prevalencia en la población general)<sup>69</sup> y de ascendencia africana (mutación p.Arg854X – 60%)<sup>70</sup>, como consecuencia de la alta incidencia de mutaciones muy concretas de esta rara enfermedad en dichas poblaciones.

## 4.5 Bases moleculares, citológicas y fisiopatológicas de la enfermedad de Pompe

### 4.5.1 Genética de la enfermedad de Pompe

La EP es una enfermedad hereditaria causada por una mutación en el gen de la GAA, localizado en el brazo largo del cromosoma 17 (locus 17q25.2-q25.3)<sup>60,71</sup>. GAA es el único gen conocido asociado con GSD II y su modo de herencia es autosómico recesivo.

El gen está completamente caracterizado (Tabla I.2). El ADNc tiene una longitud  $\approx 3,6$  kb, conteniendo 2.856 pb de secuencia codificante con una región 5' no traducida de 218 pb (exón 1) y una región 3' no traducida de 555 pb<sup>72, 73</sup>. El gen estructural completo (incluyendo las secuencias no codificantes/intrónicas) tiene una longitud de  $\approx 28$  kb y contiene 20 exones<sup>74, 75</sup>.

EXON	TAMAÑO DEL EXÓN	POSICIÓN DEL EXON EN EL ADNc	EXTREMO 5' DONADOR	EXTREMO 3' ACEPTOR	TAMAÑO DEL INTRÓN
1	>187	→ 187	CGGgttagag	tctcccagGCC	2800
2	578	188-765	ACGgtgggc	tcttctagATC	600
3	146	766-911	GCTgtgagt	tgccccagGCT	1850
4	166	912-1077	ACGgtacag	gcatgtccagCCC	84
5	97	1078-1174	TGGgtaagc	tccctccagATG	350
6	120	1175-1294	TGGgaggg	tggcctcagGAT	80
7	119	1295-1413	CTGgtgagt	tgtgtgcagGAC	88
8	132	1414-1545	GTGgtgtgt	cttcccagGAT	1120
9	11	1546-1656	AAGgtaggg	cggtgtccagGTA	670
10	114	1657-1770	ATTgtaagt	tcttgcagGAC	101
11	85	1771-1855	CTGgtcagc	ccttccagGGG	820
12	118	1856-1973	CAGgtgagg	accaccccagGGC	600
13	134	1974-2107	CAGgtaagc	gccctcccagAAA	139
14	152	2108-2259	CTGgtaggg	tgccctcagCCC	190
15	149	2260-2408	GGAggtgagt	cccctgcagGTT	3600
16	142	2409-2550	ACGgtgagt	ctccctccagGTG	450
17	150	2551-2700	CAGgtacct	cccttccagGGC	650
18	165	2701-2865	AATgtgagt	ctcggcccagAAC	350
19	153	2866-3018	AAGgcaaga	cttcccagGTC	550
20	606	3019-3624			

**Tabla I.2. Caracterización del gen GAA**<sup>74</sup>.

En el ANEXO I se presenta la secuencia completa del gen GAA.

La mayoría de los pacientes son “heterocigotos compuestos”, es decir, que han heredado dos mutaciones diferentes que al estar juntas dan lugar al desarrollo de la enfermedad. Hasta la fecha, se han identificado casi 300 mutaciones diferentes, aunque no todas se consideran patogénicas<sup>76,77</sup>. Cada día se identifican nuevas mutaciones.

El *Pompe Center at the Erasmus University* de Rotterdam, en los Países Bajos, mantiene un registro actualizado de todas mutaciones que dan lugar a la enfermedad<sup>78</sup>. La lista actualizada puede encontrarse en la web [www.pompecenter.nl](http://www.pompecenter.nl) (ANEXO II). Aproximadamente el 63% de ellas conducen a la pérdida total de actividad GAA, el 12% a una deficiencia parcial, y el 25% son no patógenas<sup>76,79</sup>.

La lista completa de mutaciones es larga, sin embargo no todas son igualmente prevalentes y, aunque algunas son más comunes, la mayoría son mutaciones privadas<sup>80-82</sup>.

Entre las mutaciones más prevalentes podemos destacar:

- **-32-13T>G, IVS 1(-13 T→G) ó IVS1-13T>G**

Es la mutación más común en Europa y se encuentra en más de la mitad de los pacientes de raza blanca<sup>80</sup>. Es una mutación típica de la variedad del adulto, de hecho, el 71% de los pacientes heterocigotos compuestos con ésta variedad de la enfermedad, incluyendo todas las etnias, presentan esta mutación.

Se trata de una transversión de Timina a Guanina en la posición -13 del sitio aceptor del intrón 1 del gen, originando splicing alternativos<sup>60</sup>: transcritos aberrantes en los que queda suprimido el primer exón codificante, el exón 2; y transcritos completos ( $\approx 10\%$ )<sup>83,84</sup> con la información adecuada para producir la enzima funcional<sup>85</sup>.

Este mecanismo particular, es responsable de la escasa, pero significativa, actividad enzimática residual presente en estos pacientes, lo que explica la expresión fenotípicamente tardía de la enfermedad<sup>86,87</sup>.

A este respecto sería de gran interés seguir profundizando en el análisis cuantitativo de la abundancia del ARNm-GAA para obtener conclusiones sobre la expresión génica, la tasa de splicing eficiente y la correlación fenotípica de los pacientes IVS1.

- **1935C>A ó Asp645Glu**

Se encuentra en un gran porcentaje (hasta el 36%) de los recién nacidos con EP de Taiwán y parte de China<sup>88,89</sup> siendo ésta la enfermedad por almacenamiento de glucógeno más prevalente en estas poblaciones<sup>64,69,90</sup>.

Esta mutación es una transversión de Citosina a Adenosina en la posición 1935 del exón 14 (C1935A), cercano al extremo 5', que provoca la sustitución de ácido glutámico en la posición 645 por ácido aspártico (Asp645Glu), dando lugar a una reducción drástica de la actividad  $\alpha$ -Gal en estos pacientes y, por lo tanto, a la forma infantil de la enfermedad<sup>91-93</sup>.

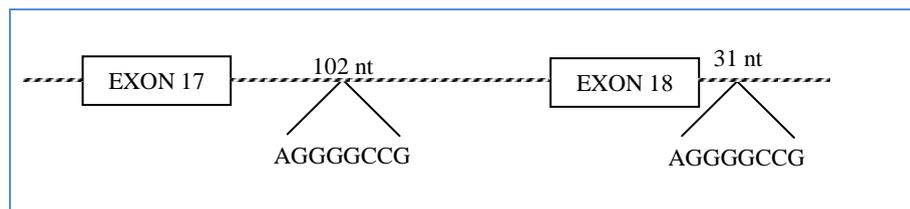
• **2560C>T ó Arg854X**

Se trata de la mutación más prevalente en las poblaciones de origen africano, con una frecuencia alélica de 0,43 entre los afroamericanos con GSD-II<sup>70</sup>. Es una mutación sin sentido en el exón 18, una transición de Citosina a Timina que produce un codón de stop en la posición 854 de la proteína, donde debiera codificarse el aminoácido Arginina (Arg854X). La transición se produce en un dinucleótido CG, un punto susceptible a mutaciones recurrentes<sup>94</sup>.

Se sintetiza una proteína truncada que se elimina y se pierde rápidamente, por lo que, si se encuentra en homocigosis, da lugar a la variedad infantil más grave de la enfermedad. Sin embargo, resulta mucho más frecuente encontrarla en heterocigosis en pacientes con las variantes juvenil-adulta de la EP, sobre todo en los de ascendencia africana.

• **Deleción del exón 18 ( $\Delta$ exon18) ó 2481+102\_2646+31del ó Gly828\_Asn882del**

El mecanismo de esta deleción consiste en la pérdida del exón debido a la existencia de dos secuencias idénticas que se repiten (AGGGGCCG) localizadas, la primera, a partir del nucleótido 102 tras el exón 17 (intrón 17), y la segunda, a partir del nucleótido 32 tras el exón 18 (intrón 18). Posiblemente durante los procesos de replicación del ADN se produce una recombinación desigual que trae consigo la pérdida del exón (Figura I.6)<sup>96</sup>.



**Figura I.6. Mecanismo de deleción del exón 18.**

La pérdida del exón supone la ausencia de síntesis de la enzima, lo que deriva en la forma infantil grave de la enfermedad.

**• 525delT ( $\Delta$ 525T) ó Glu176fsX45**

Consiste en la deleción de un par de bases (T=A) en la posición 525, lo que conduce a una modificación del marco de lectura (*frameshift* - fs) ocasionando la terminación prematura de la síntesis de la proteína, de forma que no llega a producirse ninguna actividad enzimática. Su presencia en homocigosis es responsable del desarrollo de la variedad infantil<sup>95</sup>.

Se ha especulado que el efecto fundador puede ser responsable de algunas de las mutaciones más frecuentes, siendo ésta una hipótesis ampliamente respaldada tanto por las pruebas que aporta la genética de poblaciones como por muchos autores en numerosos trabajos<sup>79, 89, 96, 97</sup>.

Se ha tratado en muchas ocasiones de establecer una adecuada correlación genotipo-fenotipo global, pero aún no ha logrado conseguirse<sup>98</sup>. Desde el punto de vista molecular, muchos de los mecanismos genéticos no se conocen con exactitud, y desde el punto de vista clínico, se observa una gran heterogeneidad entre pacientes con un genotipo similar (a excepción de la presencia de dos mutaciones nulas, lo que resulta en una ausencia total de actividad enzimática y fenotipos similares).

Así, la ausencia de correlación genotipo-fenotipo para la mayoría de las mutaciones sugiere una fisiopatología compleja de la enfermedad y unas bases moleculares aún complejas para nosotros.

La única correlación posible que puede establecerse es la centrada no en propia mutación genética sino en la actividad enzimática residual, y aún así existen unos márgenes oscuros entre los límites que separarían a las diferentes variedades. En función de esto, sí es cierto que determinadas mutaciones son más o menos prevalentes para determinada variedad. Es el caso de las mutaciones que anteriormente hemos descrito y que están bastante bien caracterizadas, siendo muy características de variedades concretas y, aunque no de forma estricta, sí que presentan ciertos rasgos fenotípicos “típicos”, que podrían constituir un principio de correlación genotipo/fenotipo.

Lo cierto es que los investigadores aún están aprendiendo acerca de la patología molecular de la enfermedad y, lo que también es de vital importancia, los factores tanto genéticos como ambientales que pueden influir en su progresión y sus resultados.

#### 4.5.2 Síntesis y maduración de la $\alpha$ -Glucosidasa ácida (GAA)

Puede resultar de interés hacer una breve referencia a la conformación de la GAA, pues es su alteración estructural y/o funcional desencadenará el proceso patológico en la EP.

La enzima lisosomal  $\alpha$ -glucosidasa ácida (GAA - **EC 3.2.1.3**), a pH ácido ( $\approx 5.4$ ), hidroliza las uniones  $\alpha$ -glucosídicas, tanto 1-4 como 1-6, de la molécula de glucógeno, presentando asimismo, una capacidad más o menos limitada de hidrolizar maltosa e isomaltosa<sup>99, 100</sup>.

La secuencia de aminoácidos que componen la estructura primaria de la enzima se presenta en la Figura I.7:

10	20	30	40	50	60	70	80
MGVRHPPCSH	RL LAVCALVS	LATAALLGHI	LLHDFLLVPR	ELSGSSPVLE	ETHPAHQQGA	SRPGPRDAQA	HPGRPRAVPT
90	100	110	120	130	140	150	160
QCDVPNSRF	DCAPDKAITQ	EQCEARGCCY	IPAKQGLQGA	QMGQPWCFFP	PSYPSYKLEN	LSSSEMGYTA	TLTRTTPTFF
170	180	190	200	210	220	230	240
PKDILTLRLD	VMMETENRLH	FTIKDPANRR	YEVPLETPHV	HSRAPSPLYS	VEFSEEPFGV	IVRRQLDGRV	LLNTTVAPLF
250	260	270	280	290	300	310	320
FADQFLQLST	SLPSQYITGL	AEHLSPLMLS	TSWTRITLWN	RDLAPTPGAN	LYGSHPFYLA	LEDGGSAGHV	FLSNSNAMDV
330	340	350	360	370	380	390	400
VLQPSPALSW	RSTGGILDVY	IFLGPPEKSV	VQQYLDVVG	PFMPYWGGLG	FHLCRWGYSS	TAITRQVVEN	MTRAHFPLDV
410	420	430	440	450	460	470	480
QWNDLDYMDS	RRDFTFNKDG	FRDFPFAMVQE	LHQGGRRYMM	IVDPAISSSG	PAGSYRYPYDE	GLRRGVFITN	ETGQPLIGKV
490	500	510	520	530	540	550	560
WPGSTAFPDP	TNPTALAWWE	DMVAEFHDQV	PFDGMWIDMN	EPSNFIRGSE	DGCPNNELEN	PPYVPGVVG	TLQAATICAS
570	580	590	600	610	620	630	640
SHQFLSTHYN	LHNLYGLTEA	IASHRALVKA	RGTRPFVISR	STFAGHGRYA	GHWTDVWSS	WEQLASSVPE	ILQFNLLGVP
650	660	670	680	690	700	710	720
LVGADVCGFL	GNTSEELCVR	WTQLGAFYPF	MRNHNSLLSL	PQEPYSFSEP	AQQAMRKALT	LRYALLPHLY	TLFHQAHVAG
730	740	750	760	770	780	790	800
ETVARPLFLE	FPKDSSTWTV	DHQLLWGEAL	LITPVLQAGK	AEVTGYFPLG	TWYDLQTPVP	EALGSLPPPP	AAPREPAIS
810	820	830	840	850	860	870	880
EGQWVTLPA	LDTINVHLRA	GYIIPLQPG	LTTESRQQP	MALAVALTGK	GEARGELFWD	DGESLEVLER	GAYTQVIFLA
890	900	910	920	930	940	950	
RNNTIVNELV	RVTSEGAGLQ	LQKVTVLGVA	TAPQQVLSNG	VPVSNFTYSP	DTKVLDDICVS	LLMGEQFLVS	WC

ESTRUCTURA DE LA $\alpha$ -GLUCOSIDASA ÁCIDA LISOSOMAL (GAA)			
Estructura primaria	Estructura primaria	952 aminoácidos	110 kDa
Procesamiento molecular	Péptido señal	1 al 27 (27 aa)	
	Propéptido	28 al 69 (42 aa)	
	Cadena	70 al 952 (883 aa)	
	Cadena	123 al 952 (830 aa)	Forma activa madura silvestre, 76 kDa
	Cadena	204 al 952 (749 aa)	Forma activa madura silvestre, 70 kDa
Posiciones clave	Centro activo	Asn 518	
	Centro activo	Glu 521	
Modificaciones post-traduccionales	Glicosilación	Asn 140	N-acetil-Glucosamina
	Glicosilación	Asn 233	N-acetil-Glucosamina
	Glicosilación	Asn 390	N-acetil-Glucosamina
	Glicosilación	Asn 470	N-acetil-Glucosamina
	Glicosilación	Asn 652	N-acetil-Glucosamina
	Glicosilación	Asn 882	N-acetil-Glucosamina
	Glicosilación	Asn 925	N-acetil-Glucosamina
	Puente disulfuro	Cys 82 ↔ Cys 109	
	Puente disulfuro	Cys 92 ↔ Cys 108	
	Puente disulfuro	Cys 103 ↔ Cys 127	

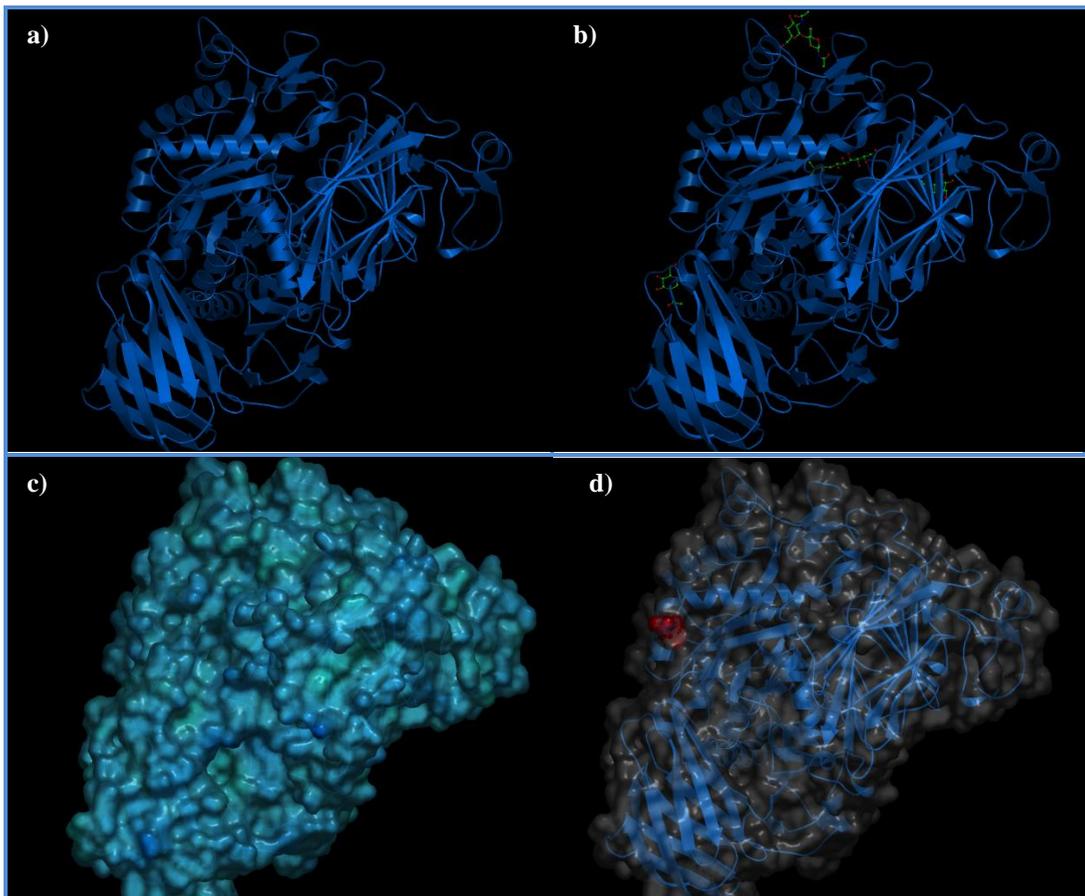
**Tabla I.3. Principales características estructurales de la GAA**

La estructura primaria de la GAA ha podido conocerse mediante clonación molecular y análisis de la secuencia de su ADNc<sup>101-104</sup>. Esta estructura primaria consiste en una proteína de 952 aminoácidos con un peso molecular aparente de 110 kDa que contiene, a su vez, siete puntos potenciales de glicosilación (Asn-X-Thr/Ser - donde X puede ser cualquier residuo

excepto Pro) con fosforilación en alguno de los oligosacáridos, siendo los residuos de manosa los más importantes al dar lugar a la manosa 6P (M6P)<sup>105, 106</sup>. Además de la glicosilación y la fosforilación, la maduración de la GAA requiere de un procesamiento proteolítico, tanto en el extremo amino como en el carboxilo terminal. Se origina en primer lugar una especie molecular intermedia de 95kDa que posteriormente continúa escindiéndose hasta obtenerse como resultado dos especies lisosomales de 76 y 70 kDa<sup>101, 106, 107</sup>.

Resumimos en la Tabla I.3 las principales características estructurales de la GAA.

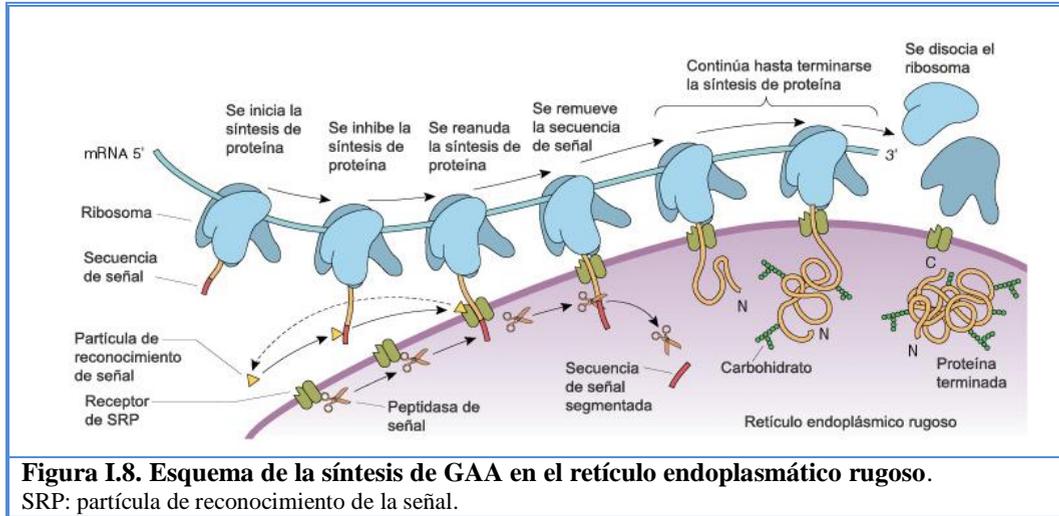
Los modelos de diseño de proteínas nos muestran la GAA del siguiente modo:



**Figura I.7. Estructura de la GAA.** Estructura secundaria de la GAA (a) incluyendo los puntos de glicosilación (b). A partir de esta estructura esquemática se deduce la estructura de superficie de la enzima (c), pudiendo a su vez representar la posición que ocupa el centro activo (d, centro activo en rojo).

El proceso de síntesis y maduración de la enzima es complejo y ha sido desde siempre objeto de estudio por parte de los investigadores<sup>105, 108</sup>.

La GAA, en común con el resto de enzimas lisosomales, presenta un péptido señal amino-terminal que permite el transporte cotraduccional con en el lumen del retículo endoplasmático, donde concluye la traducción y tiene lugar la glicosilación (Figura I.8).



La maduración de la enzima implica dos procesos que concurren en paralelo, por un lado la glicosilación y por otro la maduración proteolítica (Figuras I.9 y I.10 respectivamente).

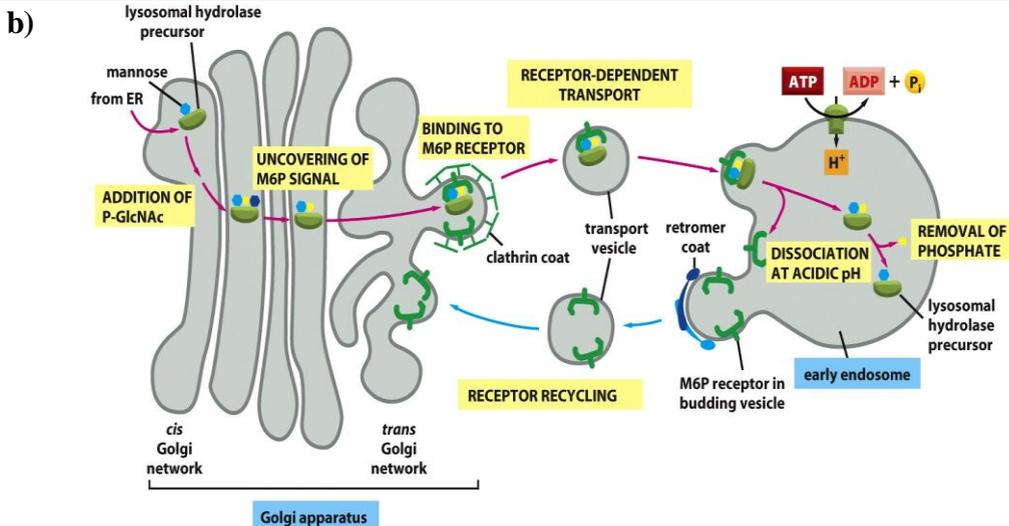
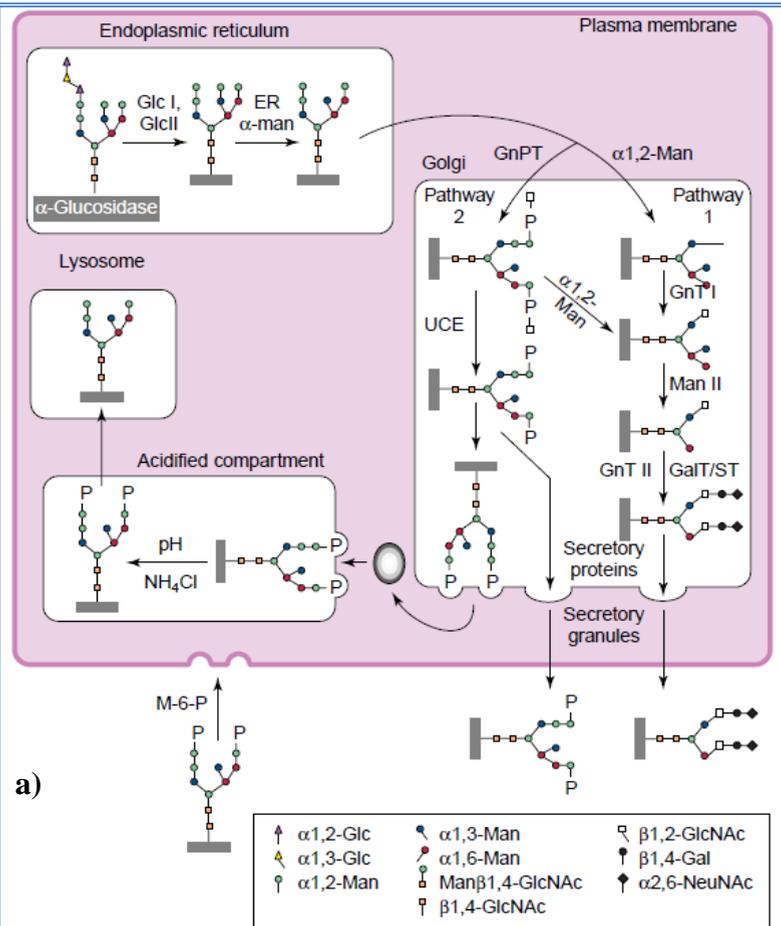
La N-glicosilación es uno de los eventos más importantes en la modificación post-traduccional de la GAA. La fosforilación de residuos de manosa garantiza el transporte eficiente de la enzima a los lisosomas a través del receptor de manosa-6-fosfato (M6PR)<sup>109, 110</sup>.

Durante la traducción, en el retículo endoplasmático, incluso antes de que la proteína se haya plegado completamente, ya comienza el proceso de glicosilación (Figuras I.8 y I.9)<sup>111, 112</sup>. Los residuos de asparagina en la secuencia Asn-X-Ser/Thr (X cualquier aminoácido excepto prolina) son los sitios potenciales para la fijación de las cadenas laterales de carbohidratos N-vinculadas (N-glicosilación) que se transfieren en bloque desde el dolicol-pirofosfato<sup>109, 113</sup>. Sin embargo, no se utilizan todos los sitios potenciales de glicosilación. Después de la eliminación de los tres residuos de glucosa terminal de la cadena de oligosacárido precursor en el retículo endoplasmático<sup>114, 115</sup>, la GAA adquiere la M6P, marcador de reconocimiento como señal lisosomal<sup>116</sup>. Esto se logra mediante la acción concertada de dos enzimas<sup>117, 118</sup>: la UDP-N-acetilglucosamina-fosfo-transferasa

**Figura I.9.**  
**Tráfico de la GAA a través de los compartimentos celulares.**

a) Se destaca la maduración respecto al proceso de glicosilación. La GAA de nueva síntesis rica en residuos de manosa se transfiere desde el retículo endoplasmático a la red Golgi, donde se adquiere el marcador de manosa 6-fosfato (M-6-P) por la acción secuencial de fosfotransferasas y fosfodiesterasas (GnPT y UCE). La enzima que contiene M6P se une a los receptores de M6P y es transportada a los lisosomas. En paralelo va modificando su estado de glicosilación hasta obtenerse la enzima lisosomal madura.

b) Transporte de la enzima hasta el lisosoma, con reciclaje del receptor de M6P.

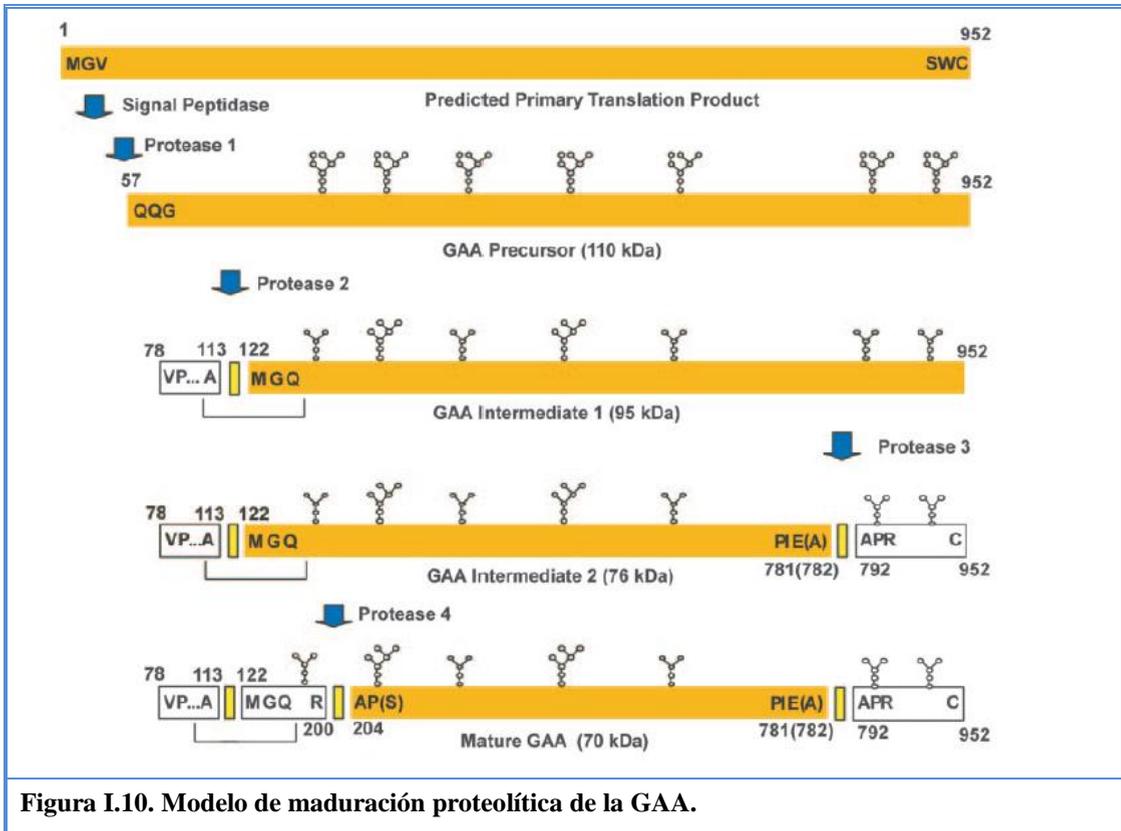


que transfiere N-acetilglucosamina-1-P del UDP-N-acetilglucosamina a residuos específicos de manosa en la proteína lisosómica para dar lugar a un intermediario fosfodiéster. Entonces, otra enzima, una fosfodiesteroglucosidasa, separa el residuo N-acetilglucosamina. El resultado es la presencia de un residuo de M6P en la proteína, que constituye un marcador de reconocimiento para la unión a un receptor de alta afinidad por esta manosa, presente en las membranas de la porción trans del aparato de Golgi. Tras la unión de la enzima al receptor tiene lugar un proceso de evaginación de la membrana del Golgi que da lugar a una vesícula donde está contenida la enzima lisosomal y que se incorpora a la ruta endocítica. En este tráfico prelisosomal, se produce la actuación de proteínas de membrana  $v$ -ATPasas (bombas de protones) que van disminuyendo gradualmente el pH hasta que los receptores pierden afinidad por la M6P quedando libres las hidrolasas (Figura I.9b). Los receptores de M6P regresan al Golgi para unirse a nuevas moléculas-ligando iniciando un nuevo ciclo.

Finalmente son siete los puntos de glicosilación (indicados en la Tabla I.3) y aunque la pérdida de dichos puntos no parece afectar de forma significativa a la actividad enzimática final, la ausencia de glicosilación en la Asn-233 sí interfiere notablemente con la formación de la enzima madura y por lo tanto es imprescindible para una actividad  $\alpha$ -glucosidasa normal<sup>110</sup>.

Por otra parte tiene lugar la maduración proteolítica de la enzima (Figura I.10)<sup>109, 119</sup>. A partir del ADNc se deduce una GAA, producto primario de traducción, de 952 aminoácidos. El primer paso proteolítico ocurre entre los aminoácidos 28 y 29 por la peptidasa señal que elimina el SRP (Figura I.8). Posteriormente aparece el primer precursor identificable en las células (110 kDa) que contiene los aminoácidos 57-952, resultado de una escisión proteolítica entre los aminoácidos 56 y 57. A continuación, se obtiene el intermediario de 95 kDa, conteniendo los aminoácidos 122-952, con la peculiaridad de permanecer covalentemente unido mediante un puente disulfuro a un péptido de 3,9 kDa correspondiente a los aminoácidos 78-113<sup>119</sup>. Son precisas divisiones múltiples para generar estos fragmentos<sup>119</sup>. Las secuencias de 57-78 y 113-122 no se han encontrado en los distintos estudios realizados, al parecer, se pierden durante este proceso.

En el siguiente paso, el intermediario de 95 kDa se escinde proteolíticamente por su extremo carboxi-terminal. Este fragmento eliminado es de 19,4 kDa (aminoácidos 792-952) y el fragmento de 3,9 kDa permanece asociado con el producto de 76 kDa (aminoácidos 122-781). En el paso final, el péptido de 76 kDa se escinde proteolíticamente cerca del extremo amino terminal para dar el complejo final que constará de los polipéptidos: 70 kDa (aa 204-781), 19,4 kDa (aa 792-952), 10,3 kDa (aa 122-200), y 3,9 kDa (aa 78-113)<sup>119</sup>.



Tras la ruta de transporte por la red cis-trans-Golgi los péptidos individuales se asocian para formar una estructura tetramérica que conforman la enzima ya madura, que pasa a los endosomas y lisosomas, lista ya para actuar. Aunque algunas enzimas se dirigen a la membrana plasmática y se vierten al exterior, son recuperadas hacia los lisosomas a través de la vía endocítica mediada por receptores M6P que reconocen específicamente el marcaje de M6P <sup>120-122</sup>.

### 4.5.3 Fundamentos del daño citológico

Antes de abordar de lleno las características citopatológicas que se producen en la EP, es necesario describir el contexto en el que éstas se desarrollan. Para ello es preciso establecer una diferenciación entre los tipos de fibras musculares esqueléticas existentes en el organismo y describir un proceso de vital importancia para la célula, la autofagia, que constituye uno de los eslabones básicos en la cadena de acontecimientos que producen el daño celular en la EP.

#### 4.5.3.1 Tipos de Fibras Musculares Esqueléticas

El músculo esquelético es un tejido muy heterogéneo, se compone de una variedad de diferentes tipos de fibras que pueden ser definidas de acuerdo a distintos parámetros. Las propiedades generales de un músculo son el resultado de la combinación de las propiedades individuales de los diferentes tipos de fibras y la proporción en la que se encuentran cada una de éstas<sup>123</sup>.

Inicialmente, las fibras musculares se clasificaron según la velocidad de contracción, y su resistencia, en músculos de contracción rápida/baja-resistencia y músculos de contracción lenta/alta-resistencia<sup>124</sup>. Esta división también se corresponde con una diferencia morfológica, ya que los músculos de contracción rápida presentan una coloración blanca en algunas especies (especialmente aves) y los músculos de contracción lenta son generalmente rojos. El enrojecimiento es el resultado de la existencia de altas cantidades de mioglobina y una alta capilaridad<sup>124</sup>. La mioglobina y el mayor contenido de capilares en los músculos rojos contribuye a una mayor capacidad oxidativa en comparación con los músculos blancos. Por otra parte, el análisis histológico muestra que existe una correlación entre la actividad de la ATPasa de miosina (mATPasa) y la velocidad de contracción muscular<sup>125</sup>. Este análisis histoquímico condujo a la división original de las fibras musculares en el Tipo I (Rojas/Lentas/Alta-resistencia) y Tipo II (Blancas/Rápidas/Baja-resistencia).

Por otra parte, la identificación de las distintas isoformas de la cadena pesada de miosina también permiten clasificar las fibras musculares, y a su vez, éstas se correlacionan con las diferentes isoformas de mATPasa<sup>126</sup>. Las tres isoformas de miosina se identificaron originalmente como MHCI, MHCIIa y MHCIIb y las tres isoformas de la mATPasa como I, IIa y IIb. Así, de forma clásica y según estas observaciones, las fibras musculares se han clasificado como fibras de tipo I, IIA y IIB (Tabla I.4).

### CLASIFICACIÓN DE LAS FIBRAS MUSCULARES

Tipo de Fibra Muscular	Contractibilidad	Color	mATPasa	Isoforma de Cadena pesada de Miosina	Metabolismo
<b>Tipo I</b>	<b>Lenta</b>	Rojo	I	MHCI	Oxidativo
<b>Tipo IIA</b>	<b>Rápida</b>	Rojo	IIA	MHCIIa	Glucolítico-Oxidativo
<b>Tipo IIB</b>	<b>Rápida</b>	Blanco	IIB	MHCIIb	Glucolítico

Además, análisis histoquímicos muestran diferente patrón enzimático en los distintos tipos de fibras musculares, lo cual refleja un metabolismo energético característico de cada tipo de fibra, poniendo de manifiesto vías metabólicas aeróbicas/oxidativo o anaeróbicas/glicolíticas<sup>123</sup>. De este modo se establece una clasificación que converge con los tres tipos de fibras: de contracción rápida glucolítica (FG), de contracción rápida oxidativas (FOG), y de contracción lenta oxidativas (SO) (Tabla I.4).

Es de vital importancia tener en cuenta esta clasificación de las fibras musculares, puesto que la deficiencia enzimática de la GAA, base de la EP, no afectará por igual a todos los tipos dependiendo del contexto metabólico y energético en que tenga lugar.

Así, los dos principales tipos de metabolismo de estas células son<sup>127-129</sup>:

- Metabolismo anaeróbico: basado principalmente en las vías catalíticas de la fosfocreatina a creatina y el glucógeno muscular a lactato.
- Metabolismo aeróbico: basado principalmente en el metabolismo oxidativo de los ácidos grasos (procedentes de los triglicéridos almacenados en tejido muscular y adiposo) y la glucosa (procedente en primer lugar del glucógeno intracelular, pero la importancia de la glucosa extracelular aumenta con la duración del ejercicio).

De forma esquemática podemos resumir las características metabólicas de los distintos tipos de fibras musculares en la siguiente Tabla <sup>130-135</sup>:

	Actividad ATPasa de Miosina	Metabolitos			Metabolismo del glucógeno	
		Mioglobina	Triglicéridos	Glucógeno	GAA	GP
Tipo I	+	+++	+++	++	++	+++
Tipo IIA	++	+++	+	++	++	+
Tipo IIB	+++	+	+	++	+	+++

	Metabolismo glucolítico		Metabolismo oxidativo			Metabolismo predominante
	PFK	GP-DH	SDH	Cit. a y c	3-HADH	
Tipo I	+	+	+++	+++	+++	Aerobio/ /Oxidativo
Tipo IIA	++	++	++	++	+	Mixto
Tipo IIB	+++	++	+	+	+	Anaerobio/ /Glucolítico

**Tabla I.5. Propiedades metabólicas de los distintos tipos de fibras musculares.**

GP: Glucógeno fosforilasa; PFK: Fosfofructoquinasa; GP-DH: Glicerofosfato deshidrogenasa; SDH: Succinato deshidrogenasa; Cit a y c: Citocromos a y c; 3-HADH: 3-Hidroxiacil deshidrogenasa

### 4.5.3.2 Citopatología de la enfermedad de Pompe

La enfermedad de Pompe se ha estudiado extensamente en las últimas décadas, pero todavía no está completamente claro cómo el defecto primario (la acumulación intralisosomal de glucógeno) lleva a la destrucción profunda del músculo esquelético.

La idea predominante durante muchos años ha sido que las células musculares tienen poco espacio para soportar el aumento de volumen que sufren los lisosomas como consecuencia del acumulo de glucógeno no degradado; por lo que el daño muscular se produce cuando este aumento de volumen conduce a un aumento de tensión y el esfuerzo mecánico al que se somete la célula supera la capacidad de resistencia de las membranas, celular e intracelular, conduciendo a su ruptura<sup>136</sup>. Sin embargo, los últimos estudios tienden a pensar que esta visión resulta incompleta y que tiene mayor importancia el fracaso del proceso de autofagia observado más recientemente tanto en pacientes con EP como en ratones GAA-knock-out.

Además, ha quedado demostrado que la deficiencia de una única enzima lisosomal (GAA) conduce a una disfunción vacuolar global y a un tráfico vesicular anormal tanto en la vía endocítica como en la autofagocítica.

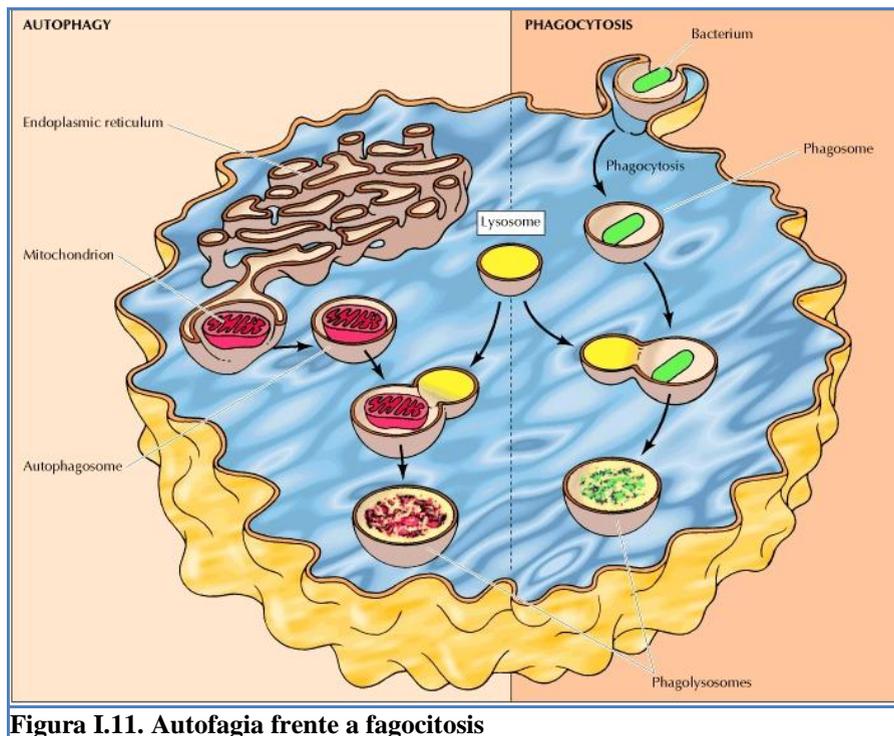
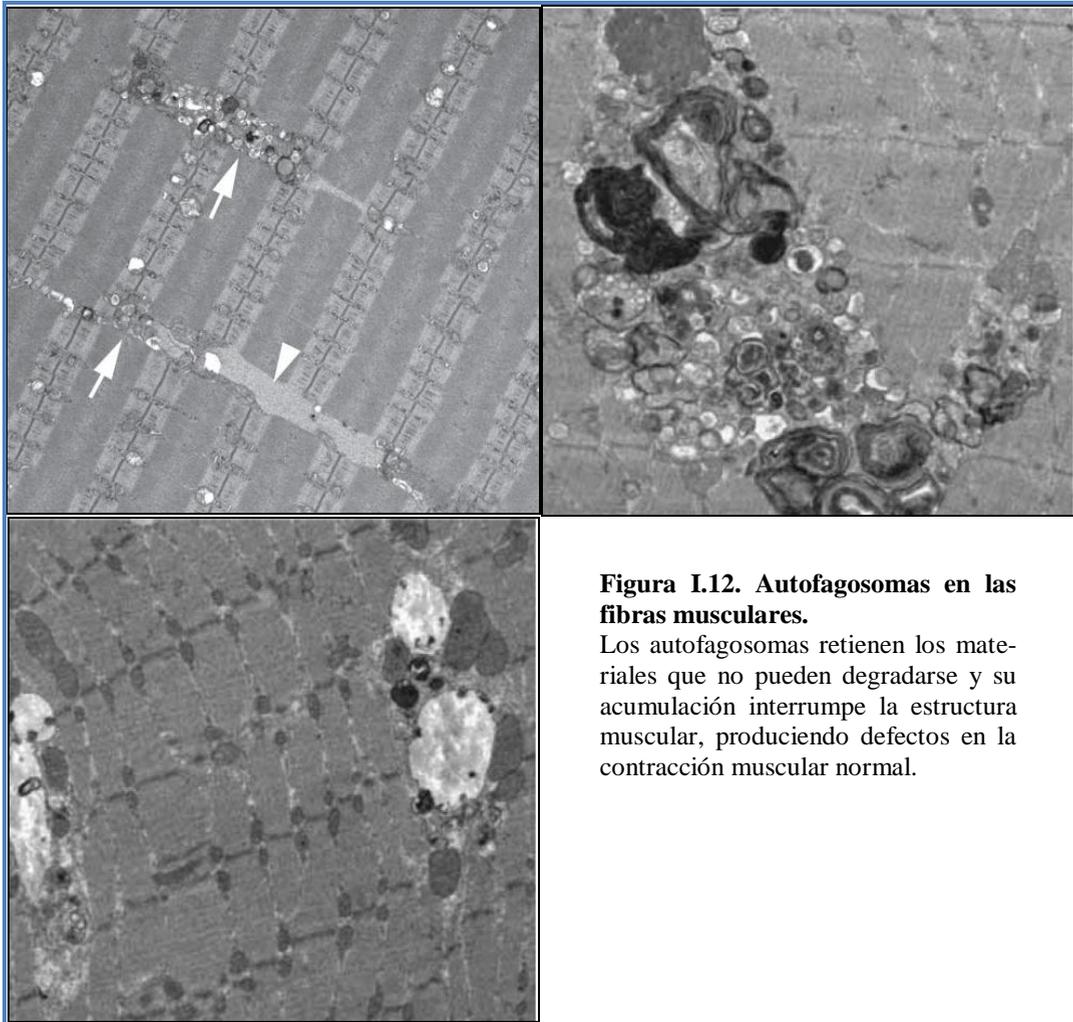


Figura I.11. Autofagia frente a fagocitosis

Este defecto en la autofagia, conlleva una acumulación de autofagosomas que en último término llega a interrumpir el aparato contráctil de las fibras musculares, y además parece interferir con la terapia de reemplazo enzimático, actuando como sumidero para la enzima recombinante evitando su integración eficiente en el sistema lisosomal.

Estas observaciones parten de los últimos ensayos clínicos dónde ha quedado registrado el éxito del tratamiento con rhGAA respecto a las anomalías cardíacas, pero no para el problema muscular<sup>137-139</sup>. La cuestión es que la situación en el músculo esquelético es más compleja y también se hará referencia a ella en el apartado *1.7. Tratamiento*.



**Figura I.12. Autofagosomas en las fibras musculares.**

Los autofagosomas retienen los materiales que no pueden degradarse y su acumulación interrumpe la estructura muscular, produciendo defectos en la contracción muscular normal.

Partiendo de ratones GAA-knock-out, se observa que tras un periodo de tratamiento con rhGAA, las fibras musculares tipo II (de metabolismo glucolítico) habían eliminado el exceso de glucógeno de una forma significativamente menos eficiente que las fibras tipo I (de metabolismo oxidativo), especialmente las de tipo IIb<sup>139, 140</sup>. Ésta “resistencia al

tratamiento”, manifestado en la escasa respuesta de las fibras musculares tipo II a la sustitución enzimática es sorprendente, ya que en los animales no tratados, el acúmulo de glucógeno en las fibras tipo II es significativamente menor que en las células cardíacas o las fibras Tipo I<sup>132, 133</sup>.

La clave parece encontrarse en el hallazgo que pone de manifiesto la presencia de grandes áreas de autofagia en fibras musculares tipo II deficientes en GAA.

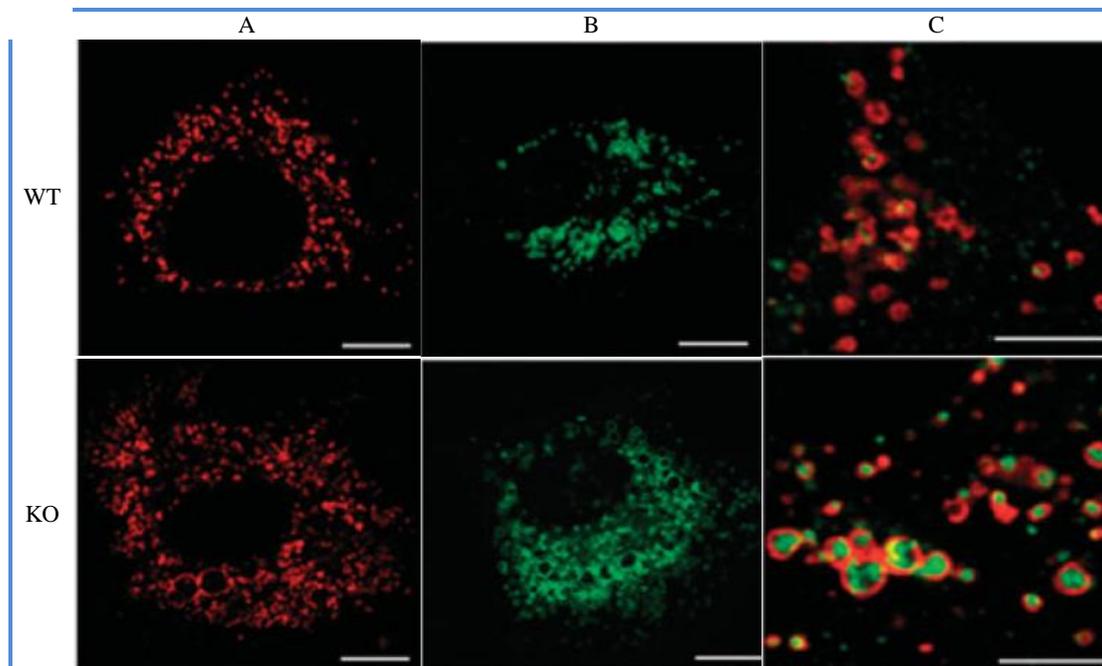
La autofagia es un proceso de degradación lisosomal de proteínas de vida larga y orgánulos dañados. En la macroautofagia (en adelante denominada autofagia), vesículas de doble membrana, los autofagosomas, secuestran citoplasma y orgánulos dañados. El autofagosoma se fusiona con los endosomas, dando lugar a los anfisomas que posteriormente se fusionan con los lisosomas donde se completa la degradación del contenido del autofagosoma<sup>141, 142</sup>.

La autofagia es un mecanismo de supervivencia crítica en condiciones de privación de nutrientes y parece jugar un papel importante en el recambio proteico basal<sup>143</sup>. En condiciones normales, autofagosomas y anfisomas son rápidamente degradados por los lisosomas, y su contenido se recicla.

Por el contrario, en las fibras musculares tipo II obtenidas de ratones GAA-knock-out, se ha observado una acumulación significativa de autofagosomas. Grandes regiones no contráctiles que contienen abundantes autofagosomas de doble membrana son claramente visibles en este tipo de fibras por microscopía electrónica (Figura I.12)<sup>144</sup>. En las fibras tipo I, por el contrario, sólo se observan un pequeño número de autofagosomas aislados.

Estos resultados pueden ser confirmados al usar microscopía confocal marcando las fibras con anticuerpos contra diferentes proteínas propias de lisosomas, endosomas y autofagosomas, observándose anomalías en su número, volumen y distribución (Figura I.13)<sup>145</sup>.

Otro dato de interés revelado en los últimos estudios hace referencia a la disposición que presentan los lisosomas en los distintos tipos de fibras musculares. Por un lado, en las fibras tipo I se disponen en largos tramos, quedando interconectados y en estrecha relación con el Golgi; no siendo así en las fibras tipo II donde existe un sistema independiente de vesículas individualizadas. Esta distribución responde al metabolismo principal de cada uno de los tipos de fibras, ya que la velocidad de reacción, la capacidad energética y las necesidades propias del tipo de contracción son diferentes.



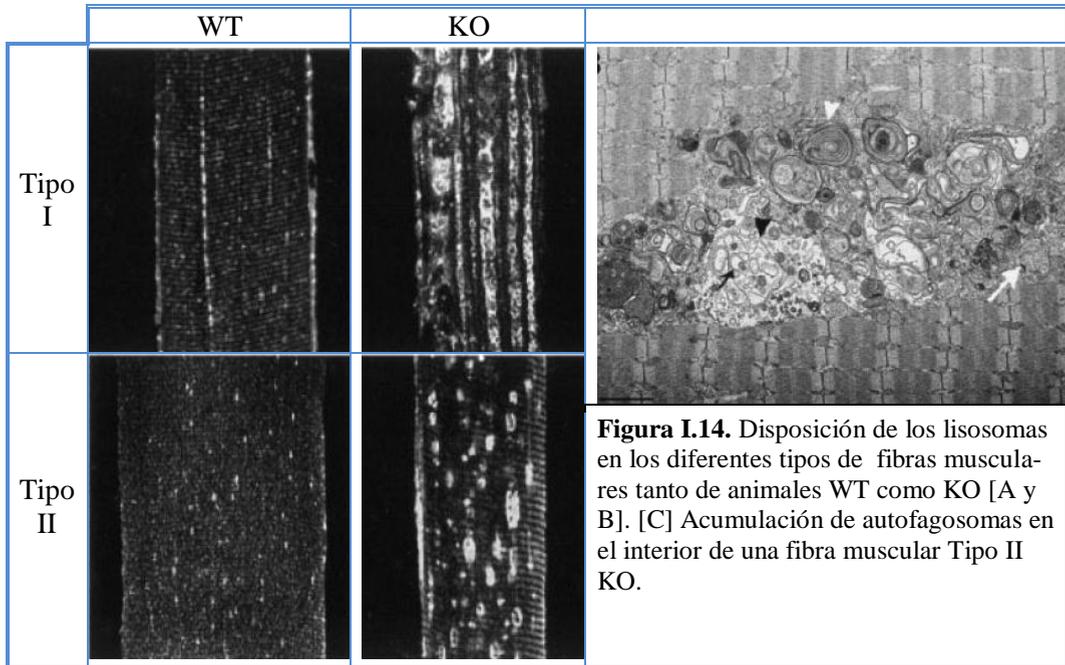
**Figura I.13.** Imágenes de microscopía confocal de mioblastos teñidos para Lámp1 (proteína de membrana asociada a lisosomas).

[A] o transfectadas con GFP-Lámp1 (Lamp 1 asociada a la proteína verde fluorescente).

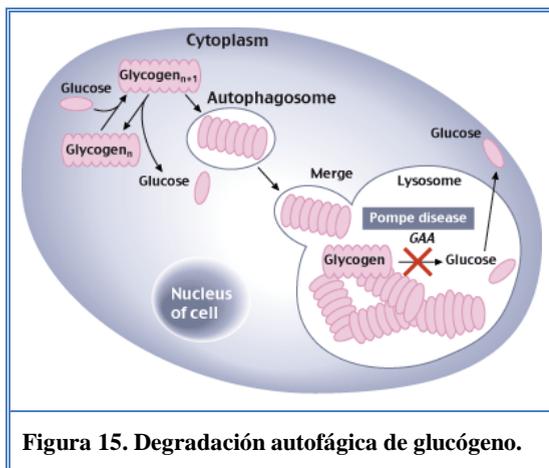
[B] que muestran el aumento en el número de endosomas tardíos y lisosomas en los animales knock-out (KO) respecto a los silvestres (WT).

[C] El aumento de volumen de los endosomas tardíos en KO se confirma por el tamaño de las estructuras doble positivo Lámp1 (rojo)/receptor de manosa-6-fosfato-cation independiente (CI-MPR) (color verde).

De este modo, en los animales KO los lisosomas de las fibras tipo I generan una estructura de forma tubular y, por el contrario, en las fibras tipo IIB KO, se distribuyen a lo largo de las fibras sin presentar conexión (Figura I.14)<sup>146</sup>. Esta disposición lisosomal tiene su reflejo en el sistema autofagosómico de modo que existe una incapacidad de los autofagosomas para fusionarse y evolucionar hasta asociarse con los lisosomas que degraden y reciclen su contenido. Así, finalmente, los autofagosomas se acumulan y se convierten en un depósito de desperdicios y material celular inútil e incluso tóxico, que acaba afectando a la correcta estructura y función celular.



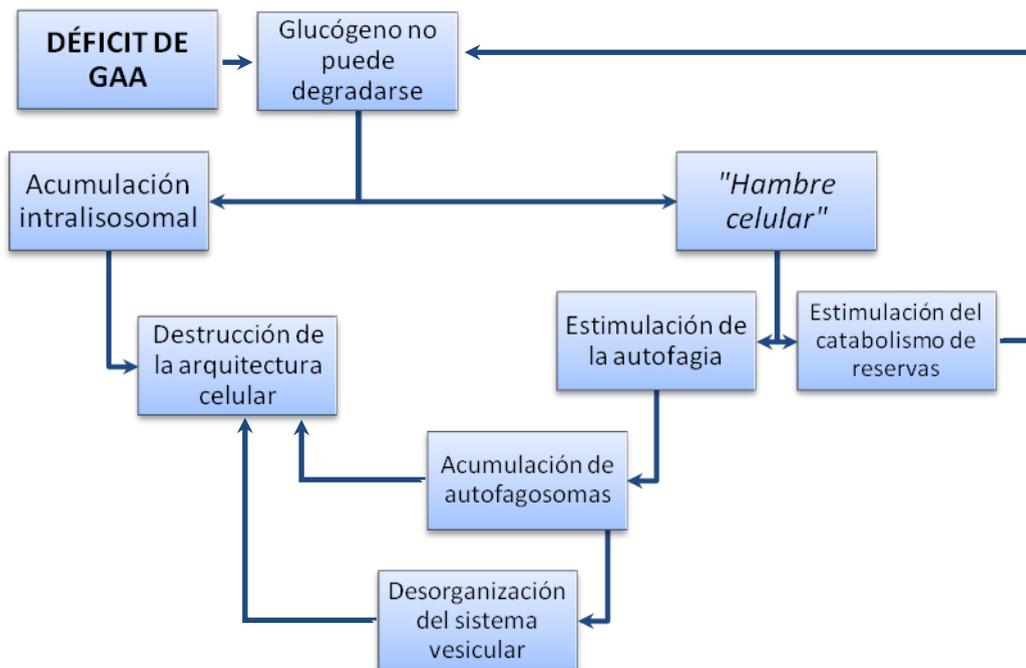
Es bien sabido que la privación nutricional induce autofagia, presumiblemente para proveer de sustratos al metabolismo energético<sup>147</sup>. Así, un aumento de la autofagia en el músculo esquelético deficiente en GAA, plantea la intrigante posibilidad de que el fracaso al digerir el glucógeno lisosomal a glucosa podrá crear un círculo vicioso al privar a las células musculares de una fuente de energía que les resulta imprescindible. Sin embargo, sólo en las fibras KO tipo II se observan grandes acúmulos de autofagosomas, lo que sugiere que la patogénesis de la enfermedad en los dos tipos de fibras es muy diferente. El papel de la GAA en las fibras tipo II podría asemejarse al desarrollado por esta enzima en hígado y corazón durante el período postnatal inmediato cuando hay una demanda masiva de liberación de glucosa<sup>148</sup>.



La autofagia de glucógeno en el período neonatal es un mecanismo accesorio de suministro de glucosa bajo condiciones de demanda masiva de producción de este azúcar. En estos casos, la degradación hidrolítica en las vacuolas de autofagia asiste a la degradación fosforolítica en el citoplasma para combatir la hipoglucemia<sup>149-151</sup>. Así, durante este período, aumenta dramáticamente la actividad GAA, y la degradación autofágica-lisosomal de glucógeno a glucosa proporciona la energía necesaria para satisfacer los requerimientos metabólicos.

De este modo, la sucesión de acontecimientos que desencadenan la citopatología basada en la alteración de la autofagia podría resumirse de la siguiente forma:

La digestión deficiente de glucógeno produce, por un lado, una acumulación intralisosomal del polisacárido, y por otro, un “hambre celular”, estimulando una fuerte respuesta autofágica que, junto con la incapacidad de las vesículas para fusionarse y descargar su contenidos en los lisosomas, lleva a una acumulación continua de autofagosomas y de “basura biológica” dando lugar a una desorganización importante de la estructura de los microtúbulos, y por tanto a graves alteraciones del tráfico vesicular, produciendo la destrucción de la arquitectura celular así como un daño celular intenso y más o menos irreversible (Figura I.16).



**Figura I.16.** Esquema del proceso autofágico en la enfermedad de Pompe

Aunque el protagonismo del daño autofágico en la biología celular de la EP ha sido toda una revelación, las observaciones realizadas a lo largo de todos estos años, así como revisiones actuales de la citopatología de la enfermedad, no pueden otorgar exclusividad a este proceso como desencadenante de todas las alteraciones estructurales y funcionales que sufren las fibras musculares. Así, parece ser que la autofagia tiene una mayor importancia en los casos en los que la EP se presenta como una forma del adulto, siendo la acumulación autofágica mínima en las formas infantiles donde las alteraciones y roturas lisosomales parecen ser la principal causa de morbilidad celular.

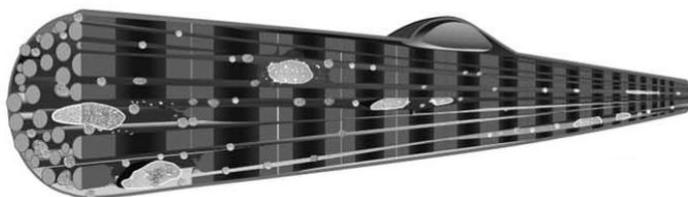
La antigua hipótesis presentada por Christian de Duve y aplicada a la enfermedad de Pompe por JL Griffin en 1984<sup>136</sup> ha sido actualizada con posterioridad por B. Thurberg y sus colaboradores sobre una base de datos más recientes y con las nuevas técnicas de microscopía electrónica<sup>140, 152</sup>.

Al caracterizar la progresión de la enfermedad en lactantes, estos autores propusieron cinco etapas:

Las células con enfermedad en estadio temprano contienen lisosomas pequeños, cargados de glucógeno, situados entre las miofibrillas que se mantienen intactas (Etapa 1). El glucógeno se sigue acumulando, y los lisosomas cargados de glucógeno aumentan en tamaño y número. En algunas zonas, el glucógeno se filtra desde los lisosomas hacia el citoplasma y tiene lugar la fragmentación de las miofibrillas (Etapa 2). En la Etapa 3 las células contienen numerosos lisosomas llenos de glucógeno que ejerciendo presión sobre el resto de estructuras celulares. Algunas membranas lisosomales de estas células finalmente se rompen vertiendo más glucógeno en el citoplasma. En la Etapa 4, la mayoría del glucógeno es citoplasmático y los elementos contráctiles de la célula han quedado completamente desplazados. En la Etapa 5 las células aparecen hinchadas al parecer debido a la infiltración de agua que acompaña al acumulo intracelular de glucógeno (Figura I.17)<sup>140</sup>.

**Etapa 1.**

- Glucógeno lisosomal
- Mínima miopatía

**Etapa 2.**

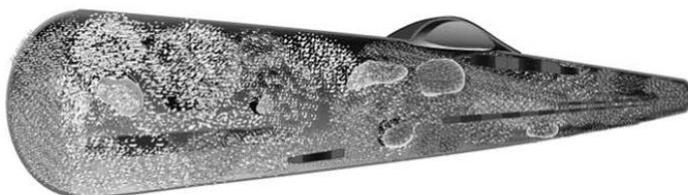
- Incremento de glucógeno lisosomal
- Glucógeno citoplasmático irregular

**Etapa 3.**

- Glucógeno lisosomal denso
- Incremento citoplasmático de glucógeno
- Severa miopatía y alteración del sistema fibrilar

**Etapa 4.**

- Disminución del glucógeno lisosomal
- Incremento citoplasmático de glucógeno

**Etapa 5.**

- Mayor parte del glucógeno es citoplasmático
- Edema celular // // infiltración de agua
- Pérdida completa del sistema fibrilar y estructura sarcoplásmica

**Figura I.17. Modelo de las 5 etapas de Thurberg.**

La acumulación lisosomal de glucógeno y la ruptura de estos orgánulos serían la principal causa de la citopatología de la EP. El proceso se dividiría en 5 etapas consecutivas hasta originar el daño celular más grave que conduce a la destrucción de todas las estructuras contráctiles de la fibra muscular<sup>140</sup>.

Esta descripción, sin embargo, creó la impresión de que el aumento en el número y volumen de los lisosomas y su ruptura constituía el principal factor universal desencadenante de la EP. Sin embargo, al igual que ocurre con el proceso patológico de la autofagia, no puede considerarse como la hipótesis absoluta.

De esta forma, la idea que engloba ambas posturas (la hipótesis lisosomal y la hipótesis autofágica) parece ser la más válida para explicar el fundamento citopatológico de la enfermedad, aunque ambos procesos no suelen presentarse juntos en la misma fibra muscular e incluso cada uno de ellos parece ser predominante en cada una de las dos formas de la EP. De este modo, en los recién nacidos no tratados, la ruptura lisosomal parece la causa más probable de lesión muscular, mientras que en pacientes no tratados de inicio tardío la descoordinación de la autofagia parece ser el mecanismo de destrucción principal de la fibra muscular.

Esto explica también las diferencias observadas al tratar a los pacientes de las distintas variantes de la enfermedad, ya que la sustitución enzimática muestra una alta efectividad anulando el mecanismo patológico de acúmulo y ruptura lisosomal (base citopatológica de la forma infantil), pero en cambio, resulta muy poco eficaz frente al daño producido por el proceso autofágico (base citopatológica de la forma del adulto). (*Véase 1.7.2 Tratamiento de sustitución enzimática*)

Como conclusión podemos decir que, la citopatología de la EP está fundamentada en la coexistencia de dos mecanismos de alteración celular, la ruptura lisosomal con acumulación de glucógeno y la alteración del proceso autofágico, que participan en mayor o menor medida en la destrucción de la estructura de la fibra muscular según el tipo de fibra y la variedad de la EP que se trate.

#### 4.5.4 Fisiopatología de la enfermedad de Pompe. Sintomatología y evolución de la enfermedad

Una vez descritos los mecanismos y procesos patológicos que tienen lugar a nivel molecular y celular, pasaremos a describir los signos y síntomas clínicos que se derivan de ellos a nivel orgánico y que suelen ser el primer indicio que apuntan hacia el diagnóstico de EP.

Todos los pacientes con EP comparten el mismo curso general de la enfermedad, de modo que la acumulación constante de glucógeno en los tejidos conduce a un debilitamiento progresivo, insuficiencia de órganos y/o la muerte, constituyendo esta concatenación de procesos el espectro de severidad de la enfermedad. Por otra parte, la gravedad varía según la edad de inicio, la participación de los órganos, el grado y la gravedad de la afectación muscular (esquelética, respiratoria, cardíaca), y la tasa de progresión<sup>153</sup>.

Existe una gran variabilidad fenotípica que ha llevado a la creación de “subtipos” basados en la edad de aparición y el grado de afectación orgánica. Estos subtipos, formas o variedades ya han sido descritas anteriormente en el apartado **1.4.3 Formas de presentación de la EP**, y son la forma infantil y la del adulto, donde la principal característica diferencial es la existencia o no de cardiopatía. Por ello, es necesario tener en cuenta que estas dos variantes de la misma patología presentan un cuadro clínico diferente que determina una colección de síntomas y una evolución diferente.

Los principales síntomas se resumen en la siguiente Tabla I.6.

Por una parte, los niños afectados, de forma general no alcanzan ciertas metas de desarrollo como sentarse solos, gatear o caminar, aunque el desarrollo mental no se encuentra afectado. La mayoría, necesitará eventualmente de la ayuda de ventilación mecánica para poder respirar debido a la afección diafragmática<sup>154</sup>.

Para los adultos, la enfermedad se puede presentar con una gran diversidad de síntomas. En muchos casos las primeras manifestaciones pueden ser la dificultad para caminar o subir escaleras debido a la debilidad muscular progresiva que afecta principalmente al tronco y las extremidades inferiores<sup>155</sup>.

Principales síntomas de la enfermedad de Pompe					
<b>SÍNTOMAS MUSCULARES</b>	Debilidad muscular e Hipotonía	Problemas de crecimiento	Problemas para caminar y subir escaleras	Retraso de los hitos motores y problemas deportivos como correr	Uso de silla de ruedas
<b>SÍNTOMAS ESQUELÉTICOS O DEFORMIDADES</b>	Lordosis / / cifosis / / escoliosis	Escápula alata	Anomalías en pies		
<b>SÍNTOMAS CARDÍACOS</b>	Cardiomiopatía hipertrófica	Cor pulmonale	Otras anomalías del corazón		
<b>SÍNTOMAS RESPIRATORIOS</b>	Síntomas respiratorios	Alteraciones respiratorias del sueño	Ventilación artificial		
<b>SÍNTOMAS NEUROLÓGICOS</b>	Afectación de los reflejos	Hipotonía	Dolor	Aneurismas	Epilepsia
<b>OTROS SÍNTOMAS</b>	Fatiga	Hiperglosia y problemas de alimentación	Dificultades para hablar	Peso inferior al normal	Hepato / /esplenomegalia

**TablaI. 6. Principales síntomas de la enfermedad de Pompe**

A continuación pasamos a repasar los diferentes signos y síntomas clínicos de la EP dividiendo la exposición en los principales aspectos que la definen:

#### ▪ **ACTIVIDAD ENZIMÁTICA**

En general, la presentación clínica se correlaciona con la cantidad de enzima funcional presente. Los casos graves de EP infantil generalmente se asocian generalmente con una actividad enzimática < 1%, y la mayoría de los pacientes no tratados mueren antes de cumplir 1 año de vida. En pacientes juveniles o adultos, la actividad residual generalmente se encuentra entre el 2-40% en comparación con controles sanos, y la sintomatología y evolución suele ser más leve y lentamente progresiva<sup>156</sup>.

## ▪ HISTORIA NATURAL DE LA ENFERMEDAD

Los pacientes con la forma infantil presentan en los primeros meses de vida una grave miocardiopatía hipertrófica, debilidad muscular generalizada e hipotonía, desencadenándose la muerte por insuficiencia cardiorrespiratoria en torno al primer año de vida<sup>157, 158</sup>.

Recientes estudios han permitido delinear la historia natural de la EP infantil a través del análisis de los casos actuales que se han ido reportando, así como de los datos bibliográficos disponibles (Tabla I.7)<sup>159 160</sup>.

<b>HISTORIA NATURAL DE LA FORMA INFANTIL DE LA EP</b>		
Inicio de los síntomas		2,0 meses (rango: 0 a 12 meses)
Diagnóstico		4,7 meses (rango: prenatal a 84,2 meses)
Asistencia respiratoria		5,9 meses (rango: 0,1 a 31,1 meses)
Muerte		8,7 meses (rango: 0,3 a 73,4 meses)
<hr/>		
Tasa de supervivencia a los 12 meses		25,7%
Tasa sin respirador a los 12 meses		16,9%
Tasa de supervivencia a los 18 meses		12,3%
Tasa sin respirador a los 18 meses		6,7%
<hr/>		
Media de 4 meses	Cardiomegalia	92%
	Hipotonía	88%
	Miocardiopatía	88%
	Dificultad respiratoria	78%
	Debilidad muscular	63%
	Dificultades de alimentación	57%
	Retraso del crecimiento	53%

**Tabla I.7. Historia natural de la forma infantil de la EP.** Se detallan la media de edad a la que aparecen los principales síntomas y el porcentaje de pacientes que a la edad media de 4 meses presentan la principal sintomatología.

Aquellos niños que sobreviven más allá del año de vida no suelen manifestar síntomas hasta después de los 6 meses, no sufren cardiopatía y presentan una mayor acti-

vidad residual GAA. Estos niños suelen estar encuadrados dentro de la forma adulta de la enfermedad, a veces con el sobrenombre de “*Enfermedad de Pompe juvenil*”<sup>89, 161</sup>.

Hablar de la forma del adulto resulta más complejo que en el caso de la forma infantil ya que incluye varios rangos de edad. Esto es debido a que el factor de clasificación más importante es la cardiopatía típica de la forma infantil, de modo que las variantes de la EP que se manifiestan tras los primeros meses y no presentan afecciones cardíacas quedan incluidas en este subtipo, encontrándose pues, pacientes desde pocos meses hasta edades muy avanzadas.

<b>HISTORIA NATURAL DE LA FORMA ADULTA DE LA EP</b>					
	Rango de edad: 0 a 1 años	Rango de edad: 1 a 6 años	Rango de edad: 6 a 18 años	Rango de edad: 18 a 68 años	<b>Todos los grupos</b>
Inicio de los síntomas	3 meses	2 años	12 años	35 años	<b>24 años</b>
Diagnóstico	3.8 años	7 años	17 años	43 años	<b>33 años</b>
Asistencia respiratoria	7,5 años	7 años	18.5 años	38 años	<b>34 años</b>
Uso de silla de ruedas	3.5 años	7 años	32 años	49 años	<b>16 años</b>
Muerte	6.1 años	22.6 años	25.1 años	44.9 años	<b>24.5 años</b>
Problemas musculares como primer síntoma	79,9 %				
Problemas Respiratorios como primer síntoma	11,1 %				
Fatiga como primer síntoma	3,9 %				
Dolor como primer síntoma	2,4 %				

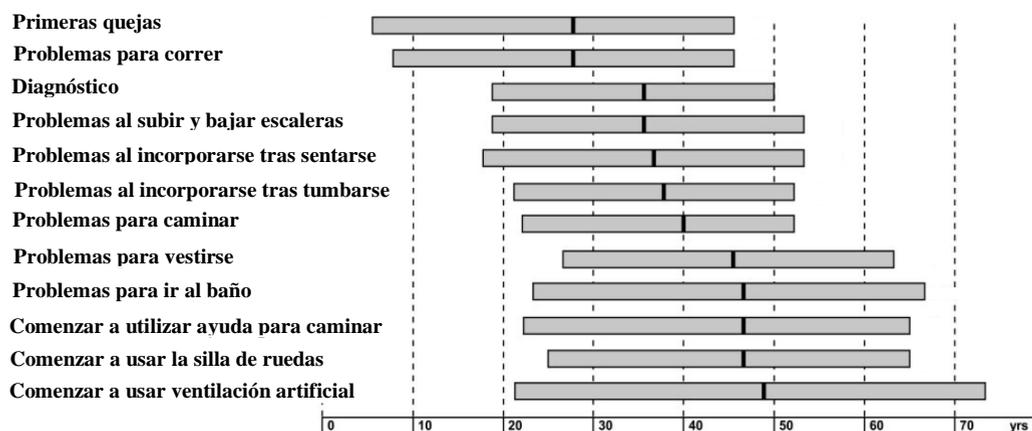
**Tabla I.8. Historia natural de la forma adulta de la EP.** Se detallan la media de edad a la que aparecen los principales síntomas y la distribución porcentual de los primeros síntomas que reportan sufrir los pacientes. La tabla se organiza por grupos de edad debido a la variabilidad de rangos de edad que existe dentro de esta forma de presentación.

La forma del adulto es una variedad de la enfermedad lentamente progresiva y, aunque la evolución y velocidad de progresión no pueden predecirse con exactitud, la muerte suele sobrevenir generalmente como consecuencia de una insuficiencia respiratoria<sup>162</sup>.

Los pacientes adultos suelen presentar debilidad muscular como uno de los principales síntomas de inicio. Los signos clínicos, tales como aleteo escapular, escoliosis, dificultades de ejecución y limitación de actividades deportivas, pueden estar presentes desde edades tempranas<sup>163</sup>. La mayoría de estos pacientes no solicitan atención médica hasta que la debilidad muscular resulta funcionalmente más significativa, lo que suele ocurrir en edades más avanzadas<sup>164</sup>. Más del 50% de los pacientes reportan síntomas de insuficiencia respiratoria o disnea de esfuerzo como parte de su sintomatología inicial<sup>162</sup>. Otras características incluyen la presentación de mialgias de esfuerzo, fatiga y, alguna vez, arritmias cardíacas.

Al igual que lo referido para la forma infantil, podemos resumir la historia natural de la forma del adulto en forma de tabla (Tabla I.8)<sup>164-166</sup>.

De forma gráfica, las incapacidades cotidianas que se van sucediendo a lo largo de la vida del enfermo quedan reflejadas a continuación:



**Figura I.18. Distribución por edad de las principales incapacidades que se van desarrollando en el curso de la forma adulta de EP<sup>166</sup>.**

Los límites de cada barra indican los percentiles 10 y 90, y la línea central la media aritmética.

## ▪ DEBILIDAD MUSCULAR Y SÍNTOMAS MUSCULOESQUELÉTICOS

La afección muscular es el signo clínico más importante y característico de la EP. La participación del sistema musculoesquelético en la EP se caracteriza por una debilidad progresiva que conduce a la disminución de la función motora, tendencia a la alteración postural y uso de patrones de compensación de movimientos<sup>167</sup>. Pueden producirse a su vez alteraciones musculoesqueléticas secundarias tales como contracturas, deformidad, y

osteoporosis<sup>168</sup>. Las funciones motoras gruesa y fina pueden estar limitadas por la debilidad. En ciertas ocasiones y como última fase de la enfermedad, puede verse comprometida la comunicación como consecuencia de la debilidad oral-motora que puede desarrollarse, de modo que el paciente queda incapacitado para hablar y expresarse<sup>169</sup>.

La miopatía es el resultado de la acumulación de glucógeno en el músculo, lo que compromete la función muscular y conduce a debilidad progresiva<sup>136, 140, 144</sup>. La distribución de la debilidad muscular refleja un patrón de cinturas escapular y pelviana, generalmente simétrica y de evolución descendente, donde los músculos pélvicos están más débiles que los de escápula<sup>165</sup>.

De los pélvicos, los aductores del muslo y glúteos se ven más afectados que los psoas<sup>170</sup>. A nivel femoral se afectan más los músculos isquiotibiales. La afectación de la musculatura pelviana induce una marcha peculiar con desplazamiento hacia atrás del punto de gravedad, marcha de pato, balanceo de pelvis, hiperlordosis... Las extremidades superiores se ven menos afectadas que las inferiores, pero de nuevo reflejan una mayor participación proximal-distal. Todos los fijadores escapulares (subescapular, trapecio inferior y romboides) participan por igual. Hay menos participación de los músculos del brazo distal y una participación moderada de los músculos flexores del cuello con preservación de la extensión. Los músculos abdominales y los extensores del tronco se encuentran frecuentemente afectados, además, de forma marcadamente severa<sup>165, 170</sup>. A medida que la enfermedad progresa, los pacientes desarrollan las limitaciones relacionadas con la debilidad del anillo óseo. Éstas incluyen dificultad para levantar los brazos sobre la cabeza, incorporarse después de agacharse, sentarse o tumbarse, saltar, subir o bajar escaleras...<sup>167</sup>

El desequilibrio respecto a la afectación de los distintos músculos conduce a alteraciones en la postura y el movimiento, desarrollándose mecanismos compensatorios destinados a neutralizar las deficiencias y contrarrestar la debilidad<sup>171</sup>. A pesar de la eficacia inicial de las compensaciones, el uso persistente de estos mecanismos puede conducir, con el tiempo, a desventajas biomecánicas, contracturas, y deformidad que desencadenan debilidad e incapacidad crecientes<sup>167, 171</sup>.

## ▪ DOLOR Y FATIGA

El dolor y la fatiga, aunque no sean síntomas del todo específicos, son quejas muy comunes entre los pacientes adultos con EP. En un estudio reciente sobre la historia natural de los pacientes adultos con EP, el 76% de los pacientes reportaba fatiga y el 46% refirió dolores con frecuencia, normalmente acompañando a la fatiga<sup>172</sup>. Estos dos signos no parecen estar relacionados con la duración o evolución de la enfermedad, pudiendo ser tanto una manifestación inicial y desaparecer posteriormente, como aparecer más tarde y perdurar de forma crónica<sup>172</sup>. Los calambres musculares y las mialgias también son frecuentes<sup>172, 173</sup>.

## ▪ INSUFICIENCIA RESPIRATORIA

Conforme progresa la EP, la debilidad muscular conduce a bajos volúmenes pulmonares, tos frecuente e improductiva, alteración de gases en sangre y trastornos respiratorios del sueño. Estos cambios son similares a los observados en cualquier paciente con debilidad neuromuscular subyacente, como la distrofia muscular de Duchenne y la atrofia muscular espinal<sup>174</sup>. Los pacientes con EP también corren un mayor riesgo de neumonía por aspiración.

Aproximadamente el 60% de los pacientes con EP de inicio tardío presenta una leve reducción de la capacidad vital (CV < 80% del teórico) y el 30-40% una reducción moderada (CV < 60% predicho)<sup>175, 176</sup>. Aunque el patrón de debilidad muscular es variable, se ha observado una correlación aproximada entre las medidas de función pulmonar y debilidad muscular proximal, en particular en la implicación diafragmática de las extremidades inferiores<sup>176</sup>. La implicación diafragmática puede ser un hallazgo precoz y la insuficiencia respiratoria es, a menudo, la primera manifestación clínica de la enfermedad<sup>177, 178</sup>.

La retención crónica de CO<sub>2</sub> (pCO<sub>2</sub> arterial y concentración sérica de bicarbonato elevadas) y la hipoxemia (disminución de la pO<sub>2</sub> arterial y la saturación de oxígeno) son signos de progreso de la debilidad muscular respiratoria, apareciendo por lo general mientras se duerme en primer lugar y posteriormente durante el día<sup>178</sup>.

De forma prácticamente inevitable se acaban desarrollando trastornos respiratorios del sueño debido a la desventaja mecánica de la posición en decúbito supino y al efecto del sueño sobre los mecanismos de control respiratorio. Se produce así, una disminución en el tono de las vías respiratorias altas, especialmente durante el sueño REM, que puede comprometer la ventilación. La hipoventilación nocturna precede normalmente a la insuficiencia respiratoria durante el día<sup>175, 179</sup>.

Si la insuficiencia respiratoria progresa, el paciente no tendrá más remedio que adoptar medidas de asistencia respiratoria. Entre el 11% y el 25% de los pacientes adultos requieren el uso de ventilación invasiva, precisando ventilación no invasiva el 29%<sup>180</sup>.

## ▪ PROBLEMAS CARDIACOS Y VASCULARES

Los problemas cardíacos más comunes en los pacientes Pompe incluyen cardiomiopatía, insuficiencia cardíaca y arritmia. También hay un componente de disfunción cardíaca que contribuye a una insuficiencia respiratoria desde el punto de vista hemodinámico y del impacto del tamaño cardíaco en la capacidad pulmonar.

En la forma infantil, los efectos de la acumulación de glucógeno son muy pronunciados en el corazón. El resultado de la acumulación del glucógeno es una hipertrofia cardiaca significativa (entre 2 y 10 z-score para la masa ventricular izquierda) que puede comenzar en el útero y que, incluso a las 4-8 semanas de edad, puede ser importante. La respuesta cardíaca a la acumulación de glucógeno puede tener como resultado una miocardiopatía hipertrófica o una cardiopatía hipertrófica y dilatada<sup>181</sup>.

En las demás variantes de EP, la participación del corazón en la patología es variable, existiendo un espectro variable en los pacientes con actividad enzimática parcial que va desde la ausencia de patología cardiaca, pasando por la hipertrofia moderada, a la disfunción cardíaca<sup>181, 182</sup>. En los pacientes con EP de inicio tardío por lo general no aparece cardiopatía clínicamente identificable. Sin embargo, no hay datos publicados de la función sistólica y diastólica en este grupo de pacientes, siendo interesante realizar estudios en este campo.

Los aneurismas cerebrales son una seria complicación de la EP, con mayor incidencia en la forma del adulto, siendo la segunda causa de muerte después de la insuficiencia respiratoria<sup>183, 184</sup>.

## ▪ SIGNOS BIOQUÍMICOS

Existen pautas comunes en cuanto a la bioquímica sanguínea de estos pacientes. Se observan elevaciones de la creatin-quinasa (CK) en el suero de los recién nacidos con EP de hasta 2000 U/L<sup>185</sup> y en los pacientes juveniles y adultos, puede alcanzar valores superiores a 15 veces el valor normal<sup>186</sup>. Sin embargo, no todos los pacientes experimentan esta elevación de CK, apareciendo hasta un 10 % con niveles normales de la enzima en suero. Aún así, es un marcador bastante sensible que conviene tener en cuenta a la hora de explorar al paciente con el fin de llegar al diagnóstico de la enfermedad.

Las enzimas aspartato aminotransferasa (AST), alanina aminotransferasa (ALT) y lactato deshidrogenasa (LDH) también suelen encontrarse elevadas, pero los niveles normales no son excluyentes de la enfermedad. Estas enzimas tienden a aumentar a medida que progresa la enfermedad<sup>187</sup>. Es extremadamente infrecuente que el enfermo de EP no presente elevación de ninguna de estas enzimas<sup>160</sup>.

Recientemente ha comenzado a tomar protagonismo un nuevo parámetro, un tetrasacárido de glucosa, excretado en orina (Glc4: Glc- $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 6-Glc- $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 4-Glc- $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 4-Glc), y que presenta una alta rentabilidad diagnóstica<sup>188</sup>. Algunos autores aseguran que la elevación de Glc4 en la orina presenta cerca del 100% de sensibilidad en la identificación de

pacientes con la forma infantil de EP. Además, como marcador biológico, ha demostrado tener una buena correlación con la respuesta clínica a la terapia de sustitución enzimática (TSE)<sup>188, 189</sup>.

Las actuales guías clínicas recomiendan el análisis de Glc4 urinaria como prueba auxiliar no invasiva que apoye el diagnóstico de EP. Este método ha sido validado para la orina seca en papel, lo que facilita la recogida y traslado de las muestras desde lugares alejados de un centro de análisis. Cuando se combina con el ensayo de la GAA en DBS, la sensibilidad diagnóstica parece estar cercana al 100%<sup>189,190</sup>. Es igualmente importante tener en cuenta que los resultados negativos de ambas pruebas descartan de forma muy significativa el diagnóstico de la enfermedad y ahorran tiempo, eliminando también la necesidad de realizar procedimientos invasivos, tales como biopsias de piel o músculo. Estos ensayos se llevan a cabo en laboratorios especializados y aún no están muy extendidos.

## ▪ PROGRESIÓN, EVOLUCION Y MORBILIDAD

La tasa de progresión de la enfermedad en los pacientes con la forma adulta es variable, pero parece ser cierta la correlación entre la aparición más temprana y la progresión más rápida de los síntomas<sup>165</sup>. El porcentaje de pacientes que requieren el uso de silla de ruedas o respirador aumenta con la duración de la enfermedad, poniendo de relieve el carácter progresivo de ésta. Las probabilidades para el uso de silla de ruedas aumentan en un 13% por cada año adicional después del diagnóstico y para la asistencia respiratoria en un 8%<sup>180</sup>.

Los signos y síntomas de la enfermedad son variados y suaves al principio, lo que a menudo supone una demora para el diagnóstico<sup>164-166</sup>. El retraso medio desde el inicio de los síntomas a la primera consulta médica con un diagnóstico más o menos definitivo, se ha calculado en un intervalo entre los 7 y 10 años y la comunidad médica aún no ha conseguido reducir este retraso diagnóstico en los últimos años.

## ▪ MUERTE

La muerte suele sobrevenir como consecuencia de fallo cardiorrespiratorio a causa de la grave miopatía en la forma infantil y por la insuficiencia respiratoria a causa de la debilidad diafragmática en la forma adulta.

Los pacientes que experimentan los primeros síntomas a edades más tempranas suelen morir antes<sup>165</sup>.

## 4.6 Diagnóstico de la enfermedad de Pompe

El diagnóstico de la enfermedad de Pompe plantea a menudo una dificultad importante debido a la rareza de la condición y a la naturaleza relativamente poco específica de las características fenotípicas propias de la enfermedad. La presentación en su variedad infantil es más fácilmente reconocible por sus características de hipotonía, debilidad generalizada, y cardiomegalia. En el caso de los pacientes que padecen la forma del adulto la presentación conlleva signos más vagos y pueden ser más difíciles de enmarcar en el contexto de la enfermedad.

El diagnóstico diferencial de la forma infantil incluye cualquiera de las causas de hipotonía o cardiomiopatía (Tabla 9)<sup>191</sup>. La hipotonía puede ser causada por afecciones de los músculos, los nervios, o la unión neuromuscular. También puede ser secundaria a enfermedades sistémicas con afectación de cualquiera de los nervios o los músculos.

El diagnóstico diferencial en los casos de formas juveniles o del adulto es más amplio, dada la inespecificidad de las características que presentan (Tabla 10)<sup>191</sup>, incluyendo también todas aquellas causas de debilidad crónica como miopatías, neuropatías y trastornos de la unión neuromuscular.

El diagnóstico precoz es de vital importancia, principalmente para la forma infantil, y requiere, tanto de una mayor conciencia entre los clínicos respecto a las características de la enfermedad, como de pruebas diagnósticas rápidas y fiables que confirmen la deficiencia de GAA.

### DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DE LA FORMA INFANTIL DE ENFERMEDAD DE POMPE

#### Hipotonía

- Etiología central (p.e. Hipoxia-isquemia)
- Miopatía congénita
- Distrofia muscular congénita
- Miopatía metabólica
  - Otras enfermedades de depósito de glucógeno
  - Enfermedad de Danon
  - Miopatía ligada a X con exceso de autofagia
  - Enfermedad de depósito de lípidos
  - Miopatía mitocondrial

#### Miopatía endocrina

- Atrofia muscular espinal
- Polineuropatía hereditaria
  - Neuropatía axonal gigante
  - Neuropatía hipomielinizante congénita

#### Miastenia gravis neonatal transitoria

#### Miastenia congénita

#### Cardiomiopatía

- Fibroelastosis endocardiaca
- Miocarditis
- Cardiomiopatía hipertrófica idiopática
- Enfermedad de depósito
  - Mucopolisacaridosis
  - Mucopolipidosis
  - Gangliosidosis
  - Enfermedad de Fabry
  - Lipofuscinosis

**DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DE LA  
FORMA ADULTA/ JUVENIL DE  
ENFERMEDAD DE POMPE**

Distrofia muscular

Miopatía metabólica

- Otras enfermedades de depósito de glucógeno
- Enfermedad de Danon
- Miopatía ligada a X con exceso de autofagia
- Enfermedad de depósito de lípidos
- Miopatía mitocondrial

Miopatía endocrina

Miopatía inflamatoria

Miopatía tóxica

Trastornos celulares del asta anterior

- Esclerosis lateral amiotrófica
- Atrofia muscular espinal tipos 2 y 3
- Enfermedad de Kennedy

Neuropatía periférica

- Neuropatía hereditaria
- Polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica
- Amiloidosis

Trastornos de la unión neuromuscular

- Miastenia gravis
- Miastenia congénita
- Síndrome miasténico Lambert-Eaton

Al ser una enfermedad de acúmulo, y por lo tanto en la que el daño fisiopatológico es progresivo, un retraso en el diagnóstico supone un aumento del deterioro orgánico que puede llegar a ser importante e incluso irreversible<sup>165,180</sup>. Por ello es de vital transcendencia establecer un diagnóstico correcto en el menor tiempo posible e iniciar el tratamiento inmediatamente. Desgraciadamente la realidad es muy distinta, ya que hasta el 20% de los pacientes sufren un retraso diagnóstico de entre 1 y 5 años<sup>191, 192</sup>.

Tras el diagnóstico, el seguimiento clínico de los pacientes debe ser individualizado para cada enfermo, pero las guías recomiendan un seguimiento estrecho de los pacientes con la variante infantil de la enfermedad y una revisión general cada seis meses para la forma adulta/juvenil<sup>191-193</sup>.

### 4.6.1 Evaluación clínica

En la mayoría de los casos, los primeros signos de alarma son los síntomas propios de la enfermedad detectados por los padres (en el caso de la forma infantil) o el propio paciente (para la forma del adulto) como la hipotonía, la debilidad muscular o la fatiga. Son por tanto las primeras señales que pueden ayudarnos a llegar a un diagnóstico y en la mayoría de las ocasiones también el punto de partida de muchos algoritmos diagnósticos (Figuras I.19 y I.20)<sup>192</sup>. La evaluación de estos síntomas debe valorarse a la luz de determinadas pruebas médicas que nos permitan cuantificar el grado y etiología de los mismos.

La radiografía de tórax y el electrocardiograma (ECG) son pruebas de detección valiosas en el algoritmo diagnóstico para la enfermedad de Pompe infantil, siendo un ecocardiograma el siguiente paso<sup>192</sup>. La radiografía de tórax pondrá de manifiesto una cardiomegalia masiva de estos pacientes y el ECG suele mostrar un intervalo PR corto, así como un complejo QRS muy alto. En la forma adulta, rara vez aparece cardiomegalia en la radiografía de tórax y el ECG no resulta de mucha utilidad. Además, en la variedad infantil el ecocardiograma muestra, ya en las primeras etapas de la enfermedad, la miocardiopatía hipertrófica típica con o sin la obstrucción del tracto de salida ventricular. En las etapas tardías de la enfermedad infantil, los pacientes pueden presentar deterioro de la función cardíaca y miocardiopatía dilatada. Entre los pacientes con cardiomiopatía, una electromiografía (EMG) puede ser útil para documentar miopatía presintomática<sup>191, 192</sup>.

La presentación clínica en los casos de adultos es típicamente la de una miopatía proximal; gran parte de la evaluación consiste en la realización de pruebas musculares (EMG, estudios de conducción nerviosa y/o biopsia muscular para histología, histoquímica y ensayo enzimático...). Las pruebas de función pulmonar son también de suma importancia pues la insuficiencia respiratoria aparece hasta en el 10% de los pacientes como el primer síntoma de debut clínico<sup>176</sup>.

▪ ALGORITMO DIAGNÓSTICO

ALGORITMO DIAGNÓSTICO DE LA FORMA INFANTIL DE LA ENFERMEDAD DE POMPE	
<b>SÍNTOMAS DE PRESENTACIÓN MÁS COMUNES</b>	<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: 25%;"> <p><b><u>CARDIO-VASCULARES</u></b> Cardiomegalia; Fallo cardíaco congestivo; Taquicardia supraventricular; Paro cardíaco durante cirugía</p> </div> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: 25%;"> <p><b><u>PULMONARES</u></b> Infecciones frecuentes; Insuficiencia/distrés respiratorio</p> </div> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: 25%;"> <p><b><u>NEUROLÓGICOS</u></b> Hipotonía; Retraso mental; Retraso de la motricidad; Pérdida de las funciones motoras tempranas</p> </div> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: 25%;"> <p><b><u>GASTRO-INTESTINALES</u></b> Retraso del desarrollo y el crecimiento; Dificultades para alimentarse</p> </div> </div>
<b>HALLAZGOS DIAGNÓSTICOS DE INTERÉS</b>	<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: 25%;"> <p><b><u>CARDIO-VASCULARES</u></b> Soplo, arritmia, sudoración excesiva (de relación cardíaca); Cardiomegalia; Cardiomiopatía; Hipertrofia +/- LVOTO progresando a cardiomiopatía dilatada</p> </div> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: 25%;"> <p><b><u>PULMONARES</u></b> Afectación respiratoria progresiva; Aleteo nasal; Uso de músculos accesorios, retracción IC y SC, disminución del murmullo vesicular en LLL; Ruidos respiratorios toscos</p> </div> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: 25%;"> <p><b><u>NEUROLÓGICOS</u></b> Retraso motor; Hipotonía, control de la cabeza, habilidad del niño para “<i>escurrirse</i>”, posición de las piernas “<i>en rana</i>”, hipertrofia de los gemelos</p> </div> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: 25%;"> <p><b><u>GASTRO-INTESTINALES</u></b> Macroglosia; Boca abierta; Tono facial disminuído; Disminución del reflejo de succión y de deglución; Dificultad para manejar las secreciones orales; Hepatomegalia.</p> </div> </div>
<b>ESTUDIOS CLÍNICOS Y DE LABORATORIO INICIALES</b>	<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: 45%;"> <p><b><u>ESTUDIOS CLÍNICOS</u></b> Radiografía de tórax - Cardiomegalia; ECG - onda R aumentada, intervalo PR corto y complejo QRS alargado; Ecocardiografía – Cardiomiopatía; Electrofisiología (EMG/NCS) - Miopatía</p> </div> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: 30%;"> <p><b><u>LABORATORIO (ORINA Y SANGRE)</u></b> Elevación de CK, AST, ALT, LDH (en sangre) y Glc4 (en orina); Baja actividad GAA en DBS o Linfocitos; Mutación familiar conocida</p> </div> <div style="width: 20%;"> <p>- Si existe actividad GAA, continuar con resto de pruebas confirmatorias si hay sospecha clínica importante.  - Sin actividad GAA, buscar estudios de confirmación de diagnóstico alternativo.</p> </div> </div>
<b>ESTUDIOS DE CONFIRMACIÓN</b>	<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: 30%;"> <p><b><u>ADN</u></b> Descripción de la mutación de GAA</p> </div> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: 35%;"> <p><b><u>ENZIMOLOGÍA</u></b> Determinación de la actividad GAA en linfocitos, fibroblastos y/o músculo. Precaución con la biopsia muscular debido a la necesidad de anestesia.</p> </div> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: 30%;"> <p><b><u>HISTOLOGÍA/HISTOQUÍMICA</u></b> Incremento de glucógeno lisosomal, “células vacuoladas”</p> </div> </div>

LVOTO: Obstrucción intraventricular izquierda (de siglas en inglés). IC: infraclavicular. SC: supraclavicular. ECG: Electrocardiograma. EMG: Electromiograma. NCS: Estudio de conducción nerviosa

## ALGORITMO DIAGNÓSTICO DE LA FORMA ADULTA DE LA ENFERMEDAD DE POMPE

<b>SÍNTOMAS DE PRESENTACIÓN MÁS COMUNES</b>	<u><b>PULMONARES</b></u> Infecciones frecuentes; Insuficiencia/distrés respiratorio; Apnea de sueño; Somnolencia; Dolores de cabeza matutinos	<u><b>MUSCULOESQUELÉTICOS</b></u> Debilidad de cinturas y extremidades; Dolor de espalda; Intolerancia al ejercicio; Síndrome de columna rígida	<u><b>GASTRO-INTESTINALES</b></u> Dificultades para alimentarse y tragar; Aumento de peso	
<b>HALLAZGOS DIAGNÓSTICOS DE INTERÉS</b>	<u><b>RESPIRATORIOS</b></u> Insuficiencia respiratoria; Ortopnea; Apnea de sueño; Disnea de esfuerzo; Tos débil	<u><b>MUSCULO-ESQUELÉTICOS</b></u> Debilidad muscular progresiva proximal de cinturas (extremidades inferiores > extremidades superiores); Anomalías en la marcha; Intolerancia al ejercicio; Lordosis/Escoliosis; Hipotonía; Dolor de espalda bajo	<u><b>GASTRO-INTESTINALES</b></u> Dificultad para mantener un peso normal; Dificultad para masticar y fatiga del músculo mandibular; Disminución del reflejo de deglución; Hepatomegalia	<u><b>CARDIO-VASCULARES</b></u> Cardiomegalia infrecuente (formas juveniles)
<b>ESTUDIOS CLÍNICOS Y DE LABORATORIO INICIALES</b>	<u><b>ESTUDIOS CLÍNICOS</b></u> Pruebas de función pulmonar acostado y sentado; Evaluación de la fuerza muscular; Electrofisiología (EMG/NCS) - Miopatía; Biopsia muscular - Histología e histoquímica	<u><b>LABORATORIO (ORINA Y SANGRE)</b></u> Elevación de CK, AST, ALT, LDH (en sangre) y Glc4 (en orina); Baja actividad GAA en DBS o Linfocitos; Mutación familiar conocida	- Si existe actividad GAA, continuar con resto de pruebas confirmatorias si hay sospecha clínica importante.  - Sin actividad GAA, buscar estudios de confirmación de diagnóstico alternativo.	
<b>ESTUDIOS DE CONFIRMACIÓN</b>	<u><b>ADN</b></u> Descripción de la mutación de GAA	<u><b>ENZIMOLOGÍA</b></u> Determinación de la actividad GAA en linfocitos, fibroblastos y/o músculo. Precaución con la biopsia muscular debido a la necesidad de anestesia.	<u><b>HISTOLOGÍA/HISTOQUÍMICA</b></u> Incremento de glucógeno lisosomal, "células vacuoladas"	

## 4.6.2 Evaluación por el laboratorio

### ▪ PERFIL BIOQUÍMICO

En la mayoría de los casos existe un perfil bioquímico característico de la enfermedad que puede suponer un apoyo importante al diagnóstico, e incluso el primero de los hallazgos.

Se revela así, una elevación de creatin-quinasa sérica (CK), siendo éste un marcador sensible aunque muy inespecíficos de la enfermedad. La mayor elevación se encuentra generalmente en los pacientes infantiles (hasta 2000 U/L). Un elevado porcentaje de los pacientes de inicio tardío también manifiestan la elevación de CK<sup>186</sup>, sin embargo, hasta el 10% de estos enfermos pueden tener una CK normal<sup>186</sup>. Los niveles de aspartato aminotransferasa (AST), alanina aminotransferasa (ALT) y lactato deshidrogenasa (LDH) también suelen ser elevados, y niveles normales no excluyen la enfermedad. Además, estas enzimas tienden a aumentar a medida que la enfermedad progresa<sup>187</sup>.

### ▪ DIAGNÓSTICO ENZIMÁTICO

El diagnóstico de enfermedad de Pompe en un paciente que presenta síntomas clínicos requiere la demostración de una deficiencia de actividad GAA. En general, los niños con la forma infantil tienen actividades GAA por debajo del 1% de la actividad media de controles sanos<sup>156</sup>, mientras que los pacientes con la variedad del adulto/juvenil presentan una actividad GAA residual, aunque reducida, y mayor que la observada en niños y, en general, la gravedad de la enfermedad se correlaciona inversamente con ésta actividad enzimática<sup>196-198</sup>.

La GAA hidroliza los enlaces  $\alpha$  1-4 y  $\alpha$  1-6 de los polímeros de glucosa y tiene una actividad óptima entre pH 3.7 y 4.5, dependiendo de la concentración de sustrato<sup>199</sup>. En un ensayo típico es necesario medir varias fracciones de la actividad GAA. Por un lado, la actividad GAA total (A $\alpha$ G) se mide a un pH ácido (3.8) e incluye toda la actividad glucosidasa ( $\alpha$ -glucosidasa ácida y maltasa glucoamilasa). Se determina también la actividad  $\alpha$ -glucosidasa neutra total (N $\alpha$ G) a pH neutro (pH 7.0) así como la actividad de la enzima inhibida por acarbosa (A $\alpha$ GIM) a pH ácido. La acarbosa inhibe específicamente a la maltasa glucoamilasa (MGA)<sup>200, 201</sup> y permite que la actividad  $\alpha$ -glucosidasa sea reflejo únicamente de la GAA efectiva mediante el cociente N $\alpha$ G/A $\alpha$ GIM. El porcentaje de inhibición de la GAA, calculado como  $[(A\alpha G - A\alpha GIM) / A\alpha G]$ , completa la información necesaria para establecer conclusiones diagnósticas basadas en la actividad enzimática.

Los principales protocolos disponibles para el diagnóstico enzimático de la enfermedad de Pompe incluyen:

- Determinación de la actividad GAA en cultivo de fibroblastos o biopsia muscular.
- Determinación de la actividad GAA intraleucocitaria e intralinfocitaria.
- Determinación de la actividad GAA en sangre seca recogida sobre papel (DBS).

Históricamente la medición de actividad GAA en cultivo de fibroblastos y músculo ha sido la más utilizada y la que daba más garantías debido a las posibles interferencias que podían producirse en leucocitos por la actividad de otras enzimas leucocitarias con actividad glucosidasa (la maltasa-glucoamilasa – MGA – EC 3.2.1.3) que enmascaran la actividad enzimática real y puede falsear el diagnóstico enzimático de la enfermedad en los ensayos de leucocitos<sup>202, 203</sup>.

La medición de la actividad GAA en fibroblastos de piel constituye actualmente el gold standard. El cultivo de fibroblastos se obtiene a partir de una biopsia de la piel a la que posteriormente se le hace la determinación enzimática. El problema es que de esta forma se requiere al menos un intervalo de 4-6 semanas para que se produzca un correcto crecimiento de las células, y por lo tanto el diagnóstico puede retrasarse considerablemente<sup>204</sup>.

La biopsia de tejido muscular, aunque resulta más invasiva, permite, además de la determinación de actividad enzimática, la cuantificación del contenido de glucógeno existente en el mismo, bien mediante cuantificación bioquímica o mediante la realización de una tinción PAS (Periodic Acid-Schiff), ambos estudios pueden realizarse rápidamente y de forma directa sobre la propia biopsia. También se puede utilizar en estudios histológicos para determinar la ubicación y cantidad de la acumulación de glucógeno en el tejido. El tejido muscular muestra la presencia de vacuolas que se tiñen positivamente para glucógeno [PAS (+)]<sup>203</sup>. En las fases avanzadas de la enfermedad, la acumulación de glucógeno se observa tanto en los lisosomas como dispersa por el citosol<sup>140</sup>. Cuantitativamente, el contenido de glucógeno muscular se eleva hasta 10 veces por encima de los valores normales en la forma infantil de la enfermedad y en menor medida en los pacientes de formas de inicio tardío<sup>203</sup>. El problema de la biopsia muscular reside en que la acumulación de glucógeno no tiene por qué ser constante ni homogénea, tanto entre los diferentes músculos como entre los distintos tipos de fibras musculares dentro de un mismo músculo. Además, existe el riesgo que presenta la anestesia para los pacientes de la forma infantil de la enfermedad de Pompe<sup>205, 206</sup>. Este riesgo debe ser considerado cuidadosamente, especialmente si el paciente ya está manifestando miocardiopatía severa y miopatía esquelética.

Como se ha mencionado, hasta hace pocos años los leucocitos aislados de sangre total no constituían una muestra fiable para la determinación de la actividad GAA, debido a la interferencia de otras glucosidasas. La interferencia más importante la representa la

maltasa-glucoamilasa (MGA), cuya actividad está presente en los leucocitos polimorfonucleares<sup>200, 201</sup>. Los ensayos actuales que utilizan exclusivamente poblaciones de linfocitos aislados de sangre total y acarbosa como inhibidor de la MGA han permitido una mejora considerable de las determinaciones de actividad GAA en sangre, con todas las ventajas que esto supone para los pacientes con respecto a la toma de muestras y las facilidades de manejo en el laboratorio<sup>207-210</sup>.

En los últimos tiempos, se han desarrollado además nuevos métodos de análisis de la actividad GAA en sangre seca recogida sobre papel cromatográfico (DBS). Este método es simple, barato y no invasivo en comparación con los actuales métodos de diagnóstico y también puede tener aplicación para programas de cribado neonatal de la enfermedad de Pompe a nivel poblacional<sup>211-218</sup>.

En el desarrollo de esta tesis quedarán excluidas las técnicas basadas en la determinación de actividad GAA en cultivo de fibroblastos y biopsia muscular, detallándose la metodología del resto de técnicas expuesta en la sección de *Materiales y Métodos*.

## ▪ GLUCOSA TETRASACÁRIDO

Existe evidencia creciente del valor diagnóstico de un tetrasacárido de glucosa detectable en la orina, la glucosa tetrasacárido (Glc4: Glc- $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 6-Glc- $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 4-Glc- $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 4-Glc), específico para la evaluación de la EP<sup>190</sup>. La Glc4 es un marcador sensible aunque no específico para la EP siendo útil tanto para el diagnóstico como para valorar la eficacia del tratamiento de los enfermos ya que muestra una muy buena correlación con la respuesta clínica de los pacientes sometidos a tratamiento enzimático sustitutivo. También puede estar elevada en otras enfermedades por almacenamiento de glucógeno, por lo que es necesaria una correlación clínica adecuada.

Este método ha sido validado incluso para orina seca recogida sobre papel cromatográfico, lo que facilita la recogida y el traslado desde lugares alejados del centro de análisis. Cuando se combina con el ensayo de actividad enzimática GAA en DBS, la sensibilidad diagnóstica se encuentra cercana al 100% para la forma infantil de la enfermedad<sup>192</sup>. Es igualmente importante tener en cuenta que los resultados negativos de ambas pruebas permiten descartar con un buen margen de seguridad el diagnóstico de la patología, eliminándose así la necesidad de procedimientos invasivos tales como biopsias de piel o músculo y acortando los tiempos de respuesta del laboratorio. Estos ensayos se realizan en laboratorios especializados y en estudios clínicos en investigación<sup>194, 195</sup>.

Debido al papel que parece desempeñar la Glc4 como biomarcador secundario de la EP, hemos considerado de interés el realizar un estudio para valorar su relevancia y

dónde quedará manifiesta la importancia que puede representar este tetrasacárido en el diagnóstico de la enfermedad (estudio expuesto en el apartado de *IV.Resultados*).

## ▪ DIAGNÓSTICO GENÉTICO

La identificación de la/s mutación/es causante/s de la enfermedad en el gen que codifica la GAA mediante análisis de ADN no es esencial para el diagnóstico de EP, pero proporciona una valiosa información para la detección familiar y el consejo genético<sup>192, 193</sup>. En situaciones poco frecuentes en que el diagnóstico no está claro por el análisis de actividad enzimática, el análisis molecular puede ser útil para confirmarlo. La identificación de la/s mutación/es que presenta el paciente y el genotipo de los familiares debe ser considerado parte de la gestión de los pacientes con EP. Al igual que con otros trastornos de depósito lisosomal, debido a la posibilidad de solapamiento de la actividad enzimática residual GAA en individuos heterocigotos, el análisis molecular del gen puede ser necesarios para confirmar el diagnóstico<sup>192</sup>.

Aunque el análisis de actividad de la enzima sigue siendo la prueba diagnóstica de elección para los individuos con EP, las pruebas moleculares tienen aplicaciones importantes. Son particularmente útiles para establecer un programa de actuación cuando la mutación es bien conocida y existen correlaciones genotipo-fenotipo<sup>79-83, 86, 88, 89, 95, 96</sup>. Además, existen mutaciones típicas de cada una de las variantes (expuesto en el punto *1.5.1 Genética de la EP*) que también aportan información valiosa.

Hay que tener en cuenta que las técnicas moleculares deben identificar los dos alelos que causan la enfermedad en el gen GAA; ello unido al tamaño del gen (20 kb, 20 exones) y a la heterogeneidad alélica subyacente a la EP supone un retraso en el tiempo de respuesta cuando se emplean estas técnicas<sup>192</sup>.

Una posible opción que barajaremos en el desarrollo de esta tesis consistirá en buscar específicamente la mutación IVS 1-13T>G en los pacientes adultos con déficit de GAA, de forma que pueden quedar completamente estudiados con un tiempo de respuesta mucho menor. Ésta mutación es la más común en Europa y se encuentra en más de la mitad de los pacientes de raza blanca. Es una mutación típica de la variedad del adulto, de hecho, el 71% de los pacientes heterocigotos compuestos con ésta variedad de la enfermedad, incluyendo todas las etnias, la presentan; de ahí la utilidad de realizar un cribado previo de forma que si queda definida como la mutación presente en el enfermo, no es necesario realizar la compleja búsqueda que suponen el resto de mutaciones menos prevalentes.

## 4.7 Tratamiento de la enfermedad de Pompe

Los esfuerzos de pacientes y clínicos por dar a conocer la EP han permitido que comiencen a desarrollarse nuevos avances terapéuticos que han mejorado la esperanza y calidad de vida de estos enfermos.

Haremos un breve repaso a las principales estrategias terapéuticas que se están implantando, así como los sistemas de seguimiento que están permitiendo monitorizar la eficacia de estos tratamientos.

### 4.7.1 Tratamiento de sustitución enzimática

En la primavera del año 2006, tanto las autoridades europeas como las estadounidenses, a través de la European Medicine Agency y la Food and Drug Administration (EMA y FDA), aprobaron la aplicación de la enzima  $\alpha$ -glucosidasa recombinante (Myozyme®) como terapia de sustitución enzimática (TSE) en pacientes con diagnóstico confirmado de enfermedad de Pompe. Este hecho constituye un hito de gran importancia en la búsqueda de una terapia definitiva para esta enfermedad hasta ahora incurable.

La eficacia del tratamiento ha sido demostrada en la forma infantil clásica en diversas publicaciones, reduciendo el riesgo de muerte y con mejoría de las funciones motoras y cardíacas, así como de la función respiratoria<sup>219-222</sup>.

La experiencia en el tratamiento de la enfermedad de Pompe del adulto muestra resultados que, si bien no son tan extraordinarios como los observados para los casos infantiles, ponen de manifiesto una notable mejora en la calidad de vida de estos pacientes con mejoría en las funciones pulmonares y motoras<sup>223, 224</sup>. El problema reside en el menor efecto que la medicación tiene sobre la musculatura esquelética<sup>225-228</sup>.

Después de la clonación del gen, comenzaron a explorarse diversos métodos de producción a gran escala de la enzima  $\alpha$ -glucosidasa humana recombinante (rhGAA).



Estos esfuerzos condujeron a la exitosa producción de la enzima recombinante humana en leche de animales transgénicos<sup>229-232</sup> y en células ováricas de hámster chino (CHO)<sup>233-236</sup>. Antes de su aplicación clínica, la viabilidad de la terapia se probó primero en ratones y codornices con EP inducida<sup>237-240</sup> (Figura I.21). Estos estudios confirmaron las altas dosis necesarias para los pacientes y también indicó que

era necesario un tratamiento prolongado (varios meses) para disminuir considerablemente el contenido de glucógeno en los tejidos, observándose dicha disminución en músculo esquelético, corazón, músculo liso e hígado<sup>182, 241-247</sup>.

## ▪ MECANISMO DE ACCIÓN

El descubrimiento de los receptores de superficie celular de M-6-P, responsables de rescatar las enzimas lisosomales del medio extracelular, es el responsable de que haya podido desarrollarse una verdadera TSE<sup>248, 249</sup>.

Como hemos indicado, actualmente, la rhGAA que se comercializa para su uso farmacológico es la enzima recombinante procedente de células transgénicas de ovario de hámster chino (CHO). Tomando una célula anfitriona CHO, ésta se modifica genéticamente introduciéndole un plásmido bacteriano que contiene el gen de la GAA humana, que posteriormente se inserta en el genoma de la célula. Estas células se cultivan en grandes biorreactores optimizando la secreción de la enzima al medio líquido. Por último se recoge el medio de cultivo y se aísla la enzima GAA humana recombinante mediante procesos de purificación que incluyen cromatografía y nanofiltración. Este producto final se filtra, se introduce en viales y se liofiliza en polvo para mejorar la estabilidad del fármaco<sup>250</sup>.

Una vez preparado el medicamento, la pauta posológica recomendada es de 20 mg/kg de peso, administrado una vez cada 2 semanas por perfusión intravenosa. Se trata por tanto de un tratamiento de exclusiva administración intrahospitalaria. Numerosos estudios indican que puede ser recomendable aumentar las dosis, llegando a los 40 mg/kg de peso si la clínica lo requiriera y el personal médico lo considerara conveniente.

	PROPIEDADES FARMACOCINÉTICAS DE LA rhGAA	
	Niños	Adultos
$C_{max}$ (µg/mL)	265	370
ABC (µg·h/mL)	1875	2590
CL (mL/h/Kg)	21,4	8,5
$t_{1/2}$ (h)	2,75	2,5

**Tabla I.11. Resultados derivados del estudio AGLU02704 a cargo de la EMA<sup>252</sup>.**

$C_{max}$ : Concentración máxima; ABC: Área bajo la curva de concentraciones plasmáticas; CL: Aclaramiento plasmático;  $t_{1/2}$ : Vida media plasmática.

La farmacocinética y farmacodinamia del medicamento ha sido ampliamente estudiada y valorada, antes de su implantación, por los distintos organismos competentes<sup>251</sup>. La EMEA, publicó en su estudio AGLU02704, los resultados contrastados que se muestran en la Tabla I.11<sup>252</sup>.

## ▪ EXPECTATIVAS CLÍNICAS Y OBJETIVOS DEL TRATAMIENTO CON TSE

La TSE trata específicamente la causa subyacente de la enfermedad mediante la sustitución de la enzima deficitaria por la enzima recombinante (rhGAA). Sin embargo, su eficacia difiere entre pacientes según la variabilidad del ritmo de progresión, el estadio y la gravedad de la enfermedad al inicio de la terapia. Aunque las respuestas al tratamiento varían entre los pacientes, el objetivo principal es prevenir, revertir, estabilizar o ralentizar la progresión de la patología en comparación con el estado del paciente en la situación basal.

De forma general podemos resumir los principales objetivos del tratamiento en una serie de puntos clave:

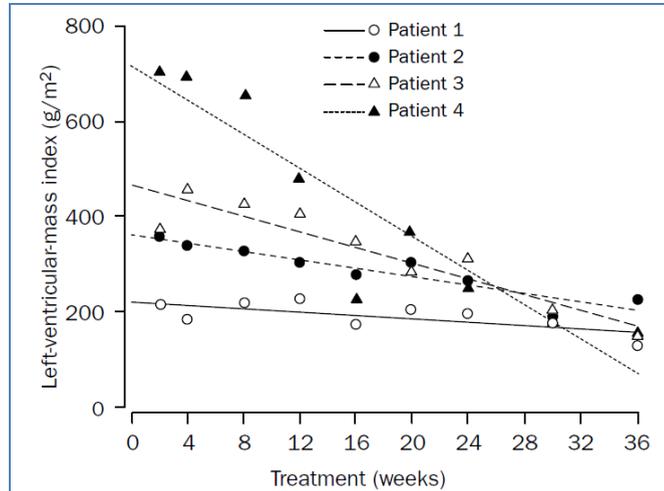
- Prevención de morbilidad significativa y prolongación de la supervivencia.
- Potenciación de la adquisición de habilidades motoras en los niños en desarrollo.
- Reducción de la miocardiopatía hipertrófica, si ésta existe.
- Mejoría o conservación de la función pulmonar, incluidos la prevención o retraso de la necesidad de soporte respiratorio.
- Mejoría de la movilidad y prevención o retraso de la asistencia para la deambulacion (uso de silla de ruedas).
- Preservación o mejoría de la independencia y calidad de vida global del paciente.
- Proporcionar mejorías funcionales en las actividades de la vida diaria.

## ▪ TRATAMIENTO EN NIÑOS

Los primeros estudios de TSE en niños se llevaron a cabo por el grupo del Erasmus Medical Center de Rotterdam con GAA recombinante humana de leche de conejos transgénicos<sup>230-232</sup>. Con el tiempo, la producción de los productos lácteos se suspendió (el método no era sostenible) y todos los pacientes que sobrevivieron pasaron a ser tratados en la enzima recombinante derivada de CHO (Myozyme®).

En este primer estudio, cuatro recién nacidos (de 2,5 a 8 meses, dos menores de 3 meses) fueron tratados por vía intravenosa con una dosis inicial de 15-20 mg/kg/semana, que posteriormente fue aumentada hasta los 40 mg/kg/semana debido a que el nivel de actividad enzimática en el músculo esquelético seguía siendo significativamente inferior a lo normal en la dosis más baja. El aumento de la dosis resultó en la normalización del nivel de actividad GAA, sin embargo, el contenido de glucógeno muscular sólo disminuyó en un paciente, el más joven<sup>230-232</sup>. Los cuatro pacientes sobrevivieron más allá de la edad crítica de 1 año<sup>230-232</sup>.

Los informes a corto plazo mostraron claramente que la enzima resultaba bien tolerada y que su acción sobre los sistemas motor y cardiaco mejoraba la morfología y función de esos tejidos. El efecto sobre el corazón resultó ser el más importante, con una reducción del índice de masa ventricular izquierda (IMVI) en todos los recién nacidos. La mejora más impresionante se observó en los dos pacientes más jóvenes (Figura I.22).



**Figura I.22. Análisis de regresión lineal del índice de masa ventricular izquierda<sup>230</sup>.**

$r = -0,74$ ,  $r = -0,93$ ,  $r = 0,93$  y  $r = 0,93$  para los pacientes 1, 2, 3 y 4 respectivamente;  $p < 0,05$  para cada uno de los pacientes.

A largo plazo el informe de seguimiento de estos cuatro niños reveló la supervivencia de todos ellos más allá de la edad de cuatro años. La miocardiopatía hipertrófica disminuyó significativamente durante las 84 semanas de TSE. Se lograron progresos notables en la función motora sobre todo en los dos niños más jóvenes. Sin embargo, el paciente más joven se hizo dependiente del respirador a la edad de 2 años y murió repentinamente a la edad de 4 años y 3 meses después de un período de fiebre intratable, presión arterial inestable y coma. Los dos pacientes de más edad en este estudio (7 y 8 meses de edad al inicio) se hicieron dependientes del respirador poco después del inicio de la terapia y no volvieron a recuperar la función respiratoria perdida<sup>232</sup>.

Tras este estudio se han sucedido muchos otros<sup>219, 222, 237, 238, 241-247</sup>. Todos ellos han demostrado que los pacientes experimentan una supervivencia más larga, una disminución de la hipertrofia cardíaca y una mejora de las funciones cardíaca y motora. Estos efectos resultan muy notables, teniendo en cuenta que sin tratamiento los pacientes infantiles suelen morir durante su primer año de vida, mientras que la esperanza de vida se prolonga de forma importante en los pacientes tratados.

La edad media de supervivencia publicada para grandes cohortes históricas de pacientes no tratados va desde los 6 a los 8 meses<sup>53, 54</sup>. La hipertrofia cardíaca progresiva y la eventual insuficiencia cardíaca que conduce a la muerte de los pacientes son rasgos característicos. Pasos importantes en el desarrollo normal, tales como la capacidad de darse la vuelta, sentarse, incorporarse o mantenerse en pie, generalmente no se logran.

El denominador común de los pacientes que respondieron mejor al tratamiento fue el comienzo precoz de la TSE (antes de los 5 meses de edad), circunstancia que suele coincidir con situaciones en las que aún no se han producido daños irreversibles<sup>216, 253-255</sup>. Se concluyó pues, que la condición clínica del paciente al inicio del tratamiento resulta más importante para el resultado final que la propia edad al inicio de la terapia. Los pacientes con parálisis completa no se recuperan.

Los estudios sobre patología y morfometría muscular corroboran estas observaciones clínicas. La preservación de las miofibrillas y la arquitectura muscular original es esencial para un buen resultado del tratamiento<sup>140, 222, 223, 231</sup>. Thurberg y sus colaboradores realizaron una clasificación fisiopatológica de las fibras musculares en la EP, estableciendo 5 etapas o fases de pérdida de la estructura muscular<sup>140</sup> (ver sección *Citopatología de la enfermedad de Pompe*). Thurberg sugiere que sólo las dos primeras etapas, en las que las miofibrillas aún se mantienen intactas son susceptibles de tratamiento<sup>140</sup>.

Sin duda alguna, el tratamiento con rhGAA cambia la historia natural de la enfermedad, pero también debe tenerse en cuenta que muchos pacientes con la forma infantil clásica muestran algún tipo de enfermedad residual a pesar de la terapia enzimática. Debe prestarse una atención especial a la fisioterapia como ayuda al sistema motor, al tratamiento inmediato de las infecciones respiratorias y la hipoventilación, a la audición y el habla, a la osteoporosis y a los riesgos durante la anestesia<sup>256-258</sup>.

A pesar de que no todos los pacientes responden con igual eficiencia, hay que concluir que la terapia enzimática ofrece inestimables perspectivas para los pacientes con enfermedad de Pompe. También debe tenerse en cuenta, que los pacientes con la forma infantil clásica tienen una mayor deficiencia enzimática y por supuesto con efectos más “devastadores”.

## ▪ TRATAMIENTO EN ADULTOS

Existe una considerable experiencia internacional y numerosas publicaciones respecto al tratamiento con rhGAA en todas las etapas de la enfermedad. Esto incluye los resultados de pacientes con las formas del adulto tratados en grandes cohortes para acreditar la verdadera eficacia del fármaco. Además, existe un número creciente de informes de casos individuales o pequeñas series de pacientes a través de la continua aparición de trabajos publicados en la literatura que confirman el efecto positivo de la rhGAA<sup>259-266</sup>.

Los principales criterios de valoración para estudiar los efectos positivos de la TSE en pacientes con la forma del adulto incluyen, en primer lugar, la mejora de las fun-

ciones motora y pulmonar, y en segundo plano, la reducción de los acúmulos de glucógeno, así como la bioquímica sanguínea favorable (Tabla 12) <sup>164</sup>.

CRITERIOS DE VALORACIÓN DE LA EFICACIA DE LA RHGAA		
Criterios de valoración principales	Función motora	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Pruebas de marcha y deambulación</li> <li>▪ Pruebas de fuerza muscular</li> </ul>
	Función cardíaca	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Pruebas de resistencia cardiovascular</li> </ul>
	Función pulmonar	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Porcentaje del valor estimado de la capacidad vital forzada (CVF)</li> </ul>
Criterios de valoración secundarios	Pruebas funcionales	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Fuerza del músculo esquelético evaluada mediante puntuación del examen muscular cuantitativo (quantitative muscle testing, QMT) de brazos y piernas</li> <li>▪ Fuerza de los músculos respiratorios evaluada mediante el porcentaje del valor estimado de la presión inspiratoria máxima y de la presión espiratoria máxima.</li> </ul>
	Pruebas bioquímicas	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Reducción de los acúmulos de glucógeno</li> <li>▪ Disminución de la creatin-quinasa, transaminasas hepáticas y lactato deshidrogenasa</li> </ul>

En torno a los 18 meses de tratamiento ya comienzan a superarse los primeros criterios de valoración, observándose cómo los pacientes consiguen aumentar su función motora al demostrar mejoras significativas en las pruebas de marcha y deambulación. Tras 78 semanas de tratamiento se consigue un incremento en el porcentaje del valor estimado de la CVF, mientras que los estudios informan que este valor, no sólo no se mantiene, sino que incluso disminuye en los pacientes no tratados. El resto de criterios secundarios también se van consiguiendo progresivamente a lo largo del tiempo en el que se sigue administrando la enzima recombinante <sup>245, 267</sup>.

Se han reportado efectos beneficiosos de la rhGAA en todas las etapas de la enfermedad incluyendo la reducción de la dependencia del ventilador, las mejoras en la movilidad y la calidad de vida, y en muchos casos, la prevención o retraso de la progresión de la enfermedad <sup>259-267</sup>. Como la enfermedad de Pompe es progresiva, tanto la mejoría clínica como la estabilización pueden ser consideradas como efectos terapéuticos.

Además, la disponibilidad de una terapia eficaz aumenta la necesidad de un mejor diagnóstico y reconocimiento de la enfermedad, para que el tratamiento pueda comenzar antes de que existan daños musculares irreversibles <sup>253-255</sup>.

El tratamiento óptimo de la enfermedad de Pompe no puede centrarse exclusivamente en la TSE, sino que requiere de una combinación de terapias específicas y de apoyo para las diferentes complicaciones que se derivan de la deficiencia enzimática y que siem-

pre están presentes. Dado que los pacientes con EP pueden tener una gama tan amplia de manifestaciones clínicas y alteraciones funcionales, el tratamiento y seguimiento de éstos requiere su atención por un equipo multidisciplinario.

#### ▪ LIMITACIONES DE LA TSE

A pesar de los excelentes resultados alcanzados en los estudios clínicos y preclínicos de la TSE en relación a la mejoría de la patología cardiaca y la reducción significativa de la mortalidad en recién nacidos, los efectos en el músculo esquelético son menos importantes de lo previsto<sup>139, 225</sup>.

Cierto que existe una mejoría global de las funciones motoras, pero se ha observado una resistencia al tratamiento por parte de algunas fibras musculares, las fibras musculares de tipo II B<sup>225</sup> (ver secciones *Tipos de Fibras musculares* y *Citopatología en la enfermedad de Pompe*).

Además, la necesidad de infusiones intravenosas de por vida, el alto costo de la enzima recombinante, y las dosis extremadamente altas de la droga (hasta ~ 80 veces superiores a los de otros EDL) constituyen una serie de limitaciones que hacen que la rhGAA ya no sea la panacea que en un principio parecía ser.

Una última limitación y la más importante, derivada de la propia utilización de la rhGAA, es la aparición de anticuerpos frente a la enzima recombinante<sup>268-271</sup>.

La respuesta inmune a la TSE se observa en la mayoría de los pacientes con EP en tratamiento. Los pacientes que nunca han estado en contacto con la proteína GAA por fallos de la síntesis de forma constitutiva (lo que se conoce como *cross-reactive immunological material negative* o CRIM-negativos) desarrollan un título de anticuerpos anti-rhGAA especialmente alto.

Ha podido establecerse una ligera correlación entre la evolución de estos anticuerpos y la disminución en la respuesta a la TSE<sup>268-270</sup>, de hecho se ha observado una mejor respuesta al tratamiento en los pacientes CRIM positivos<sup>272</sup> (*cross-reactive immunological material positive* o con expresión de la proteína GAA, sea cual sea el nivel de actividad residual que ésta presente).

Además de la aparente inactivación de la enzima, estos anticuerpos pueden actuar a diferentes niveles, desde interfiriendo en la correcta incorporación de la enzima a las células, hasta desencadenar otra serie de efectos adversos acompañando a las infusiones del tratamiento.

### 4.7.2 Nutrición y Terapia de ejercicio (NTE)

La NTE consiste en una combinación de dieta baja en carbohidratos y con un alto contenido en proteínas así como un plan de ejercicio aeróbico submáximo diario. Esta terapia está dirigida a reducir al mínimo la acumulación de glucógeno, aumentando la síntesis de proteínas musculares y aumentar la proporción de fibras tipo I frente a las tipo II.

Así, los pacientes que cumplen plenamente con NTE muestran mejor pronóstico y una tasa de deterioro muscular significativamente mucho más lenta<sup>273-275</sup>.

Por un lado, el plan de ejercicio está orientado a alcanzar el 60%-65% del consumo máximo de oxígeno, o una frecuencia cardíaca máxima para la edad correspondiente. Se establece un programa de una hora de duración de ejercicio aeróbico donde se instruye a los pacientes para realizar un primer periodo de carrera en cinta durante 45-50 minutos, seguido de ejercicios aeróbicos de parte superior del cuerpo durante 10-15 minutos. Los pacientes no ambulatorios, o con dificultades para hacer ejercicio en la cinta, se ejercitan en bicicleta estática durante un período similar de tiempo o se les pide que caminen con un andador si es posible<sup>276, 277</sup>.

Por otro lado, la dieta ha de ser baja en carbohidratos y de alto valor proteico, debiendo estar estrictamente controlada. Consta de una distribución calórica de: 25% -30% de proteínas, 30% -35% de hidratos de carbono, y el 35%-40% de grasas. Además, los pacientes deben ingerir por vía oral comprimidos de 1,5 g de L-alanina, 4 veces/día<sup>278-282</sup>.

La combinación de una dieta rica en proteínas y pobre en carbohidratos, junto al programa de ejercicio aeróbico, fue ideada para contrarrestar el efecto patógeno de aumento de la deposición de glucógeno muscular y disminuir la síntesis de proteínas musculares<sup>283</sup>. La baja ingesta de hidratos de carbono está orientada a minimizar la acumulación de glucógeno tanto intra como extralisosomal, mientras que el complemento de proteínas y alanina trata de aumentar la síntesis de proteínas musculares reduciendo al mínimo la degradación neta del músculo, los dos procesos patogénicos que concurren en la EP<sup>284, 285</sup>. Además, el ejercicio aeróbico submáximo diario está orientado a disminuir la demanda de glucogenolisis muscular y aumentar la utilización de ácidos grasos por el músculo<sup>286</sup>. Una disminución en la demanda de glucogenolisis muscular también hace disminuir la demanda de aminoácidos como fuente alternativa de combustible y así se disminuye aún más la proteolisis muscular.

Como último aporte de este tipo de terapia, cabe destacar un beneficio más. Desde hace tiempo se reconoce que el músculo esquelético de los mamíferos tiene el potencial de alterar su fenotipo, y que el ejercicio aeróbico submáximo regular es el medio más

eficaz para desarrollar las fibras musculares tipo I y disminuir las fibras tipo II<sup>286</sup>. Al mismo tiempo, el mayor estado de nutrición y la suplementación frecuente con alanina proporcionada por NTE reducirá al mínimo los períodos de privación nutricional muscular<sup>282</sup>. Ambos acontecimientos tendrán como resultado la reducción al mínimo el desarrollo de los procesos autofágicos patológicos y por lo tanto se minimizará la destrucción del músculo<sup>287, 288</sup>.

Así pues, la nutrición y el ejercicio (NTE) puede ralentizar de forma manifiesta el inexorable deterioro de la función muscular y mejorar significativamente la historia natural de esta enfermedad, pudiendo resultar un apoyo realmente importante para la TSE.

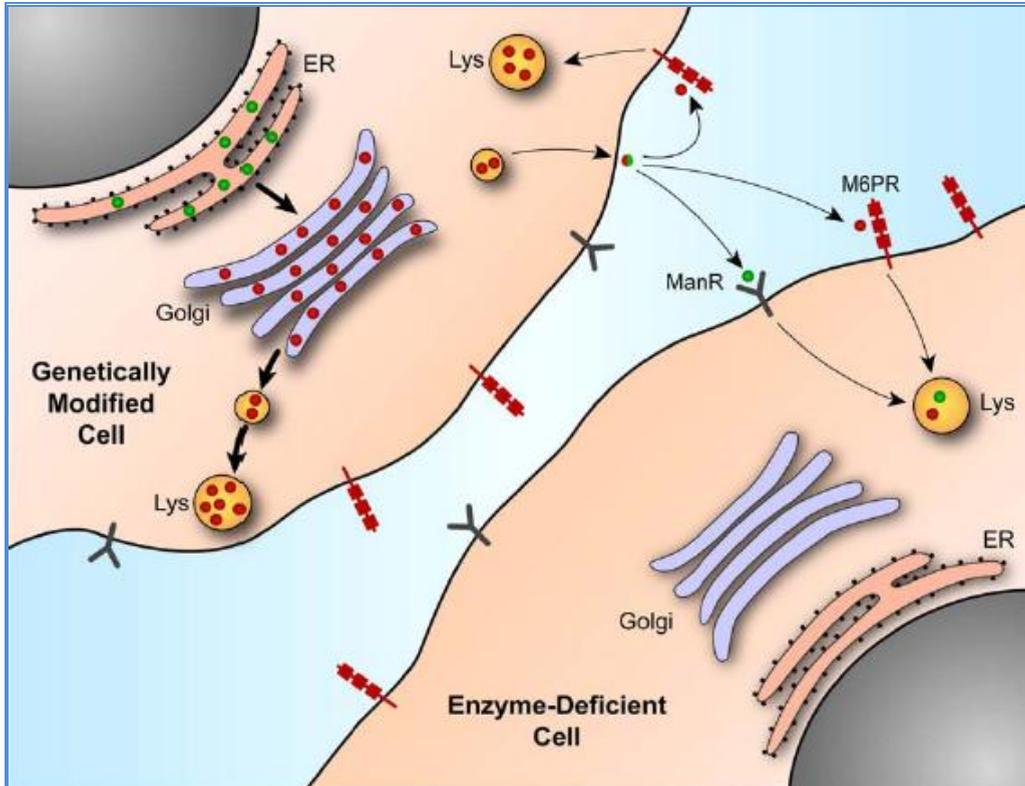
### 4.7.3 Tratamiento por Terapia génica

A pesar de las decepciones sufridas en los primeros estudios clínicos, hay un interés continuo en el desarrollo de la terapia génica para la EP ya que, de tener éxito, supondría la primera estrategia verdaderamente curativa de cuantas existen hasta el momento.

Las principales ventajas que presenta la EP para abordar este tipo de estrategia son:

- La EP resulta de alteraciones monogénicas y normalmente están bien caracterizadas<sup>74, 78, 290</sup>.
- El sistema de recaptación enzimática a través del receptor M-6-P catión independiente, permite que la transducción génica pueda realizarse a nivel de un órgano de depósito (p.e. el hígado) lo que podría permitir una secreción de enzima a la circulación a niveles terapéuticos<sup>248, 249, 291</sup>.
- La cantidad de enzima necesaria para un nivel suficiente de corrección de la enfermedad no requiere la recuperación completa de la actividad enzimática; en este sentido, la potencia de los vectores de transferencia de genes necesarios para facilitar la producción de niveles terapéuticos de la enzima no tiene por qué ser muy alta<sup>292, 293</sup>.
- Aunque no está claro si la sobreexpresión sostenida de esta hidrolasa tendrá consecuencias adversas, es poco probable que se requiera una regulación estricta de los niveles de producción de la enzima, en parte debido a que el pH óptimo para su actividad la hacen inactiva en la circulación sistémica donde el pH es más básico que el lisosomal<sup>99, 100</sup>.
- Por otra parte, existe un gran número de modelos animales de esta enfermedad, lo que facilita la realización de todos estos estudios<sup>37, 237-240</sup>.

Uno de los enfoques consiste, como se ha indicado, en conseguir una expresión de alto nivel de la enzima en un órgano de depósito, como puede ser el hígado<sup>294</sup>. Esto puede conseguirse tras la administración intravenosa de vectores de generación de adenovirus (Ad), de forma que aparecen niveles terapéuticos de enzima circulante y se consigue la reducción de los depósitos de glucógeno. Éste enfoque ya ha tenido éxito en los modelos murinos de EP<sup>295, 296</sup>. El problema es que la expresión de la enzima es transitoria debido a la intensa respuesta inmune que el organismo desencadena contra el vector adenovirus<sup>297</sup>.



**Figura I.23. Tráfico de enzimas lisosomales y corrección cruzada.** La GAA es glicosilada (círculos verdes) en el retículo endoplasmático (RE) de las células genéticamente modificadas. Luego se le adhiere la M-6-P (círculos rojos) en el aparato de Golgi. La mayoría (flechas gruesas) seguirán la vía de maduración normal de los lisosomas (Lys). Una minoría (flechas finas) son secretadas. La enzima extracelular puede unirse a los receptores de manosa (ManR) o al receptor de M-6-P (M6PR) de la membrana plasmática. Ambos receptores median endocitosis interiorizan las enzimas exógenas.

Una posible solución al problema consiste en combinar al Ad con la expresión de CTLA-4<sup>298</sup>. Ésta es una proteína de la superfamilia de las inmunoglobulinas; su nombre deriva de sus iniciales *Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4* (Antígeno 4 del linfocito T citotóxico) y se expresa en los linfocitos T Helper transmitiendo una señal inhibitoria a las células T. Sin embargo, los resultados en este sentido muestran una reducción de la respuesta inmune sólo durante cortos periodos de tiempo<sup>298, 299</sup>.

Los últimos avances realizados apuntan a la utilización de los vectores de 3ª generación, también llamados Ad gutless o Ad helper dependientes<sup>300</sup>. Para producir estos vectores se necesitan tres elementos fundamentales: un Ad gutless con el gen terapéutico; un Ad helper que aporte las proteínas virales necesarias in trans y; una línea celular permisiva para la producción de adenovirus (es decir, un tipo de células aptas para que los Ad se reproduzcan en ellas). Los Ad gutless, también son denominados “dependientes de

ayudante” (ó Ad helper-dependent), ya que sin la presencia de los Ad helper carecen de la maquinaria viral necesaria para reproducirse. Es decir, para producir las cantidades necesarias de Ad gutless útiles en la terapia, se necesita la presencia de los Ad helper, que son quienes suministran toda la “infraestructura de producción” del virus. Los Ad gutless, al no contener ninguna región viral codificante, no generan respuesta inmune celular y tienen una capacidad de hasta 36 Kpb. Se ha demostrado que la expresión de los genes que incorporan puede durar toda la vida del organismo<sup>301, 302</sup>.

Otro enfoque en el uso de vectores ha llevado a la utilización de retrovirus (Retroviridae) como agentes de transfección para el gen GAA deficiente<sup>303</sup>. Éstos son virus de ARN que retrotranscriben su genoma a una cadena simple de ADN para luego formar la doble cadena, pudiendo ésta a continuación, integrarse en los cromosomas. Los virus se unen a los receptores de la célula huésped a través de proteínas de la envoltura glicoproteica que se incorporan en la superficie del virión. Para usar los retrovirus como vectores víricos para terapia génica inicialmente se eliminan los genes responsables de su replicación y se reemplazan estas regiones por el gen GAA seguido de un gen marcador. Del genoma vírico quedaban las secuencias LTR; y los elementos necesarios para producir los vectores a gran escala y para transformar las células son aportados desde otros vectores<sup>304</sup>.

Los retrovirus como vectores en terapia génica presentan un inconveniente considerable, y es que la enzima integrasa puede insertar el material genético en cualquier zona del genoma del huésped, pudiendo causar efectos deletéreos como la modificación en el patrón de la expresión (efecto posicional) o la mutagénesis de un gen silvestre por inserción<sup>305</sup>.

Los lentivirus son una familia de retrovirus compleja que inducen una enfermedad crónica y progresiva, por lo general asociada con la infección de macrófagos. Se han desarrollado vectores de transferencia génica para la EP que se derivan de los lentivirus para complementar los aspectos positivos de los vectores retrovirales (integración eficiente, ausencia de genes virales con información genética transferida al receptor, y falta de inmunidad pre-existente en el receptor) con la capacidad de infectar a células bien diferenciadas y que no se dividen, lo que aporta seguridad a este tipo de tratamiento<sup>306, 307</sup>. Otra ventaja que presentan los lentivirus es que su tasa de expresión se mantiene durante largos periodos de tiempo (de ahí que originen enfermedades crónicas)<sup>308</sup>; la razón no se conoce, aunque puede residir en las características intrínsecas de las regiones LTR virales y/o en la disposición en diferentes sitios de la cromatina durante la integración.

Por estos motivos, muchos laboratorios han optado por la utilización de vectores derivados de lentivirus para utilizarlos en el tratamiento de la EP.

#### 4.7.4 Terapia de mejora enzimática: Chaperonas

La terapia de mejora de la enzima (Enzyme enhancement therapy - EET) es un enfoque reciente que está despertando gran interés. La EET se basa en el concepto de que la pérdida de función de la enzima se debe a menudo a mutaciones sin sentido que causan un mal plegamiento y una rápida degradación de la enzima<sup>309, 310</sup>. Así, puede obtenerse un rescate parcial de la actividad enzimática utilizando inhibidores competitivos dirigidos al sitio activo, de modo que su unión al centro catalítico mejore la estabilidad y el plegamiento de la proteína mutada con conformaciones alteradas actuando del mismo modo que las chaperonas celulares<sup>311</sup>. La principal desventaja de este tipo de enfoque es que su eficacia depende de una actividad enzimática residual y puede no resultar útil en ciertas mutaciones en el gen GAA<sup>311</sup>.

Varios inhibidores y derivados de desoxinojirimicina (DNJ) han sido probados en diferentes enfermedades de depósito lisosomal. Se han determinado una serie de mutaciones sin sentido (Y455F, P545L, G549R, L552P...) presentes en los pacientes Pompe que dan como resultado una GAA de estructura anómala susceptibles de ser tratadas con este tipo de terapia y frente a las que ya existen resultados muy prometedores<sup>310, 312, 313</sup>.

Los estudios recientes, las bases de datos de pacientes, y el conocimiento actual que en general se tiene de la EP, dan una cifra aproximada de la fracción de pacientes susceptibles de ser tratados por éste sistema en torno al 10-15% debido a presentar mutaciones de este tipo<sup>76, 78-82, 313</sup>. Esto limita el uso de la terapia farmacológica a una población restringida de pacientes. Sin embargo, ha quedado demostrado que las chaperonas farmacológicas representan una herramienta eficaz además en la mejora de la eficacia de la TSE, con consecuencias beneficiosas para muchos pacientes con EP<sup>314, 315</sup>.

Es sabido que no sólo la GAA de los pacientes puede presentar deficiencias, sino también la actividad rhGAA, una vez incorporada la enzima a la célula, puede ser subóptima. Se ha demostrado *in vitro*, en fibroblastos de enfermos<sup>316</sup>, e *in vivo*, en células musculares de un modelo de ratón EP<sup>317</sup>, que una fracción de rhGAA no presenta actividad intracelular, siendo por lo tanto ineficaz. Es posible que la incorporación de la enzima recombinante en los compartimentos celulares la exponga a procesos de degradación y la interacción con chaperonas farmacológicas mejora, al menos en parte y en este sentido, la estabilidad de la enzima. Por lo tanto, la EET no solo tendría como objetivo tratar deficiencias estructurales de la GAA sino que también sería importante como terapia coadyuvante de la TSE<sup>315</sup>.

Otra ventaja importante, radica en el mejor perfil de biodistribución que presentan las chaperonas, y lo que es más, que parece aportar al TSE clásico<sup>315</sup>. En los modelos

animales de la enfermedad, se ha informado que la coadministración TSE-EET tiene como resultado un aumento de los niveles enzimáticos en músculo esquelético y diafragma. En una enfermedad como la enfermedad de Pompe, aumentar los niveles de corrección por TSE en estos músculos es una meta terapéutica importante que puede tener efectos muy notorios en la progresión de la enfermedad, trastornos motores, y necesidad de ventilación invasiva<sup>314, 315</sup>.

#### 4.7.5 Seguimiento del tratamiento de la enfermedad de Pompe

No sólo es importante ofrecer al paciente una terapia eficaz, también es necesario establecer una correcta monitorización del tratamiento para asegurar que el protocolo seguido es el correcto y poder anticiparnos, e incluso predecir, las posibles complicaciones que puedan presentarse<sup>318, 319</sup>.

El seguimiento, al igual que la terapia, también puede hacerse según distintos enfoques, histológico, inmunológico, bioquímico...etc. De forma clásica, los estudios histoquímicos eran la única herramienta disponible que aportaba una evidencia confirmada de la evolución del paciente conforme iba recibiendo tratamiento<sup>25, 320</sup>. La cuantificación de los acúmulos de glucógeno en las biopsias musculares proporcionaban una valiosa información sobre la respuesta al tratamiento<sup>202, 203</sup>. Sin embargo, éste es un procedimiento invasivo que entraña riesgos importantes para este tipo de pacientes, sobre todo haciéndose necesaria el uso de anestesia, situación peligrosa para estos enfermos en los que suele existir un contexto de partida de insuficiencia respiratoria<sup>205, 206, 256</sup>.

En los últimos años ha tomado importancia un tetrasacárido de glucosa, la denominada glucosa tetrasacárido (Glc4: Glc- $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 6-Glc- $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 4-Glc- $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 4-Glc), resultado de la degradación intravascular del glucógeno<sup>321</sup>. Normalmente se excreta en la orina en concentraciones bajas y su excreción urinaria está elevada en los pacientes con EP<sup>194</sup>. Ya hemos hablado del carácter diagnóstico que presenta la determinación de los niveles de Glc4 urinaria<sup>188, 192-194</sup>, pero también presenta valor clínico como marcador de seguimiento del tratamiento, principalmente de la TSE<sup>195, 322</sup>.

La correlación entre la disminución del glucógeno muscular de los pacientes sometidos a TSE y las concentraciones urinarias de Glc4 ha sido demostrada en varios trabajos de ámbito internacional<sup>321-323</sup>.

Teniendo de base estos resultados, también en nuestra unidad de referencia de diagnóstico y seguimiento de la EP, se determinan los niveles de Glc4 para la monitorización del tratamiento de estos pacientes por técnicas de HPLC.

#### 4.7.6 Perspectivas futuras

La situación actual en cuanto al tratamiento es muy esperanzadora, aunque es necesario profundizar en los estudios para conseguir superar todas las limitaciones que presentan las distintas estrategias: la TSE debe conseguir mejorar su acción a nivel de la musculatura esquelética, sobre todo las fibras Tipo IIB<sup>325</sup>; la terapia génica necesita alcanzar la funcionalidad y eficacia necesarias para su uso a nivel clínico<sup>326</sup>; y tanto la NTE como el uso de chaperonas químicas no pueden por sí solas fundamentar un tratamiento sino que se conciben como terapias de apoyo, sin ser realmente tratamientos de primera línea.

Así, hemos de seguir avanzando hasta llegar a encontrar una terapia verdaderamente curativa.



# OBJETIVOS



## II. OBJETIVOS

El diagnóstico de la enfermedad de Pompe plantea a menudo una dificultad importante debido a la rareza de la condición y a la naturaleza relativamente poco específica de las características fenotípicas propias de la enfermedad. Por ello, el laboratorio clínico desempeña un papel esencial en el diagnóstico de esta patología.

La hipótesis de partida para esta Tesis se basa en la capacidad que presenta el Laboratorio Clínico para poder llegar a un diagnóstico definitivo de esta patología, aportando pruebas y evidencias que confirman la reducción de la actividad  $\alpha$ -glucosidasa ácida, fundamento de la enfermedad.

Para ello, en el desarrollo de esta Tesis intentaremos alcanzar los siguientes objetivos:

- Contribuir a la actualización de información sobre la enfermedad de Pompe, a través de una extensa revisión bibliográfica que presente los principales puntos de conocimiento sobre el contexto, diagnóstico y tratamiento de la enfermedad.
- Implantación de la determinación de  $\alpha$ -glucosidasa ácida en DBS como método de screening diagnóstico para la enfermedad de Pompe, y estudio de la veracidad de esta determinación mediante la participación en programas de evaluación externa de la calidad.
- Consenso de la determinación de  $\alpha$ -glucosidasa ácida intralinfocitaria como método gold-standard para el diagnóstico de la enfermedad de Pompe (pros/contras vs uso de biopsia muscular y/o fibroblastos).
- Valoración de la glucosa tetrasacárido como biomarcador diagnóstico de la enfermedad de Pompe.
- Contribución del estudio molecular de la mutación IVS1-13T>G al diagnóstico definitivo de la enfermedad de Pompe.
- Proposición de un algoritmo diagnóstico de la enfermedad de Pompe para el Laboratorio Clínico.



# **MATERIALES Y MÉTODOS**



### III. MATERIALES Y MÉTODOS

La parte experimental de esta Tesis se apoya en protocolos ya utilizados y contrastados por otros grupos de investigación. En muchos de los experimentos hemos realizado modificaciones, adaptaciones y/o mejoras, para optimizar los resultados obtenidos según nuestro sistema de trabajo.

La cartera de pruebas analíticas realizadas para llegar al diagnóstico de la enfermedad de Pompe incluye:

- Determinación de actividad GAA en sangre seca recogida sobre papel (DBS).
- Determinación de actividad GAA intralinfocitaria.
- Determinación de los niveles de Glucosetetrasacárido en orina de 24 horas.
- Estudio molecular de la mutación IVS1-13T>G.

#### 1. Pacientes

Las muestras incluidas en cada uno de los experimentos realizados durante el desarrollo de la Tesis y cuyos resultados nos permitieron obtener conclusiones, proceden de una serie de pacientes distribuidos prácticamente por toda la geografía española y enviados a nuestro laboratorio.

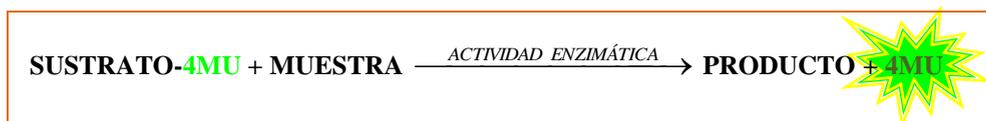
Éste se encuentra ubicado en el Servicio de Bioquímica Clínica del Hospital Universitario Virgen del Rocío de Sevilla, constituye un centro de referencia para la enfermedad de Pompe y en él se reciben muestras de pacientes de todo el país con alta sospecha de padecer esta dolencia.

Los principales síntomas de los pacientes sometidos a nuestras pruebas diagnósticas fueron: la existencia de miopatía, mialgias, debilidad muscular, intolerancia al ejercicio, distrofia de cinturas, miocardiopatía (en casos infantiles), insuficiencia respiratoria y la hiperCKemia.

También se realizaron los estudios correspondientes a familiares de pacientes ya diagnosticados, normalmente al manifestar algún signo de la enfermedad.

## 2. Determinación de actividad $\alpha$ -Glucosidasa ácida en sangre seca recogida sobre papel

La determinación se llevó a cabo según la técnica descrita por Chamoles et al (2004)<sup>214</sup> basada en la acción de la enzima  $\alpha$ -Glucosidasa ácida lisosomal presente en la muestra del paciente, sobre el sustrato 4-metilumbeliferil- $\alpha$ -D-glucopiranosido, liberando 4-metilumbeliferona que a pH alcalino produce fluorescencia proporcional a la actividad de la enzima.



La muestra de partida fue sangre seca recogida sobre papel (DBS, del inglés *Dried Blood Specimen*).

### 2.1. Toma de muestras

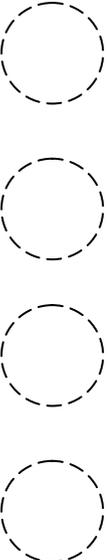
Como en todas las determinaciones analíticas, la correcta obtención de la muestra fue vital para poder realizar un buen estudio y obtener resultados fiables.

Las tarjetas de papel utilizadas por nuestro laboratorio son cartulinas de papel cromatográfico S&S903 en las que quedan indicadas por círculos las zonas donde debe aplicarse la sangre. Además, contienen información a completar por el clínico sobre los datos demográficos del paciente y la determinación que se desea realizar.

Para una adecuada obtención de la muestra de DBS, ya sea para la determinación de actividad GAA como para cualquier otra enzima, deben seguirse los siguientes pasos:

- Sumergir la mano de la punción en agua a 37-40°C.
- Desinfectar la zona de la punción con alcohol (No usar desinfectantes que contengan yodo).
- Realizar la punción con una lanceta estéril.
- Despreciar la primera gota de sangre que suele estar contaminada con el desinfectante u otras impurezas.
- Esperar hasta que se haya formado una gota lo suficientemente grande.

- Tocar la tarjeta de papel con la gota de sangre de forma constante sin presionar sobre el papel.
- No presione el dedo con excesiva fuerza para evitar la expulsión de líquido intersticial.
- Espere hasta que la sangre haya calado hasta el reverso del papel teniendo cuidado de no sobrepasar los límites del círculo indicado. ESTE PUNTO TIENE ESPECIAL IMPORTANCIA.
- No vuelva a aplicar sangre sobre el mismo círculo.
- Deje secar la sangre sobre una superficie limpia, lisa y no absorbente.
- Rellene la tarjeta correctamente con los datos correspondientes. Introduzca la tarjeta en una bolsa de plástico, ciérrela adecuadamente y envíela al Laboratorio.

	Initials and Family Name	<input type="text"/>	<input type="text"/>
	Date of Birth	<input type="text"/>	Sex <input type="checkbox"/> M <input type="checkbox"/> F Date of collection <input type="text"/>
	Patient Identification Number	<input type="text"/>	
	Requesting Physician	<input type="text"/>	
	Hospital Name	<input type="text"/>	
	 Address	<input type="text"/>	
	Country	<input type="text"/>	
	 Telephone	<input type="text"/>	
 E-mail	<input type="text"/>		
Test Requested:	<input type="checkbox"/> Fabry Disease	<input type="checkbox"/> Pompe Disease	<input type="checkbox"/> Gaucher Disease <input type="checkbox"/> MPSI

**Figura III.1. Modelo de tarjeta de recogida de muestras DBS**

## 2.2. Reactivos

Todos los reactivos utilizados fueron de calidad analítica, proporcionados por Sigma, Merck, Mallinckrodt o similares, salvo que se indique lo contrario. En la especificación de cada uno de los materiales y métodos, queda indicada la procedencia de cada reactivo.

### 2.2.1. Tampón acetato de sodio 0.4M, ácido y neutro

Merck 1.06267.1000. PM: 136.08

Se prepararon sendos tampones acetato 1M ácido y neutro respectivamente, para luego preparar a partir de ellos las soluciones tampón 0.4M a los mismos pH's.

La conservación se realizó en alícuotas a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### 2.2.2. Sustrato: 4-metil-umbeliferil- $\alpha$ -D-glucopiranosido 2.8mM

SIGMA, M-9766. PM:338.3

El sustrato era un preparado que fue necesario diluir en los tampones de acetato de sodio que preparamos anteriormente. Así, para elaborar la solución ácida del sustrato, se disolvió la 4-MU- $\alpha$ -D-glucopiranosido en el tampón acetato ácido, y para la solución neutra de sustrato se disolvió en el tampón acetato neutro.

La conservación se realizó en alícuotas a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### 2.2.3. Inhibidor: Acarbosa 40 $\mu$ M

SIGMA A-8980. PM: 645.61

La solución de acarbosa destinada a inhibir específicamente la actividad enzimática maltasa glucoamilasa (MGA)<sup>200, 201</sup>, permitió que la actividad  $\alpha$ -glucosidasa fuera reflejo únicamente de la GAA efectiva.

Su preparación consistió únicamente en disolver la solución madre de acarbosa, hasta una concentración de 40 $\mu$ M con agua destilada.

La conservación se realizó en alícuotas a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### 2.2.4. Solución Testigo: 4-Metilumbeliferona

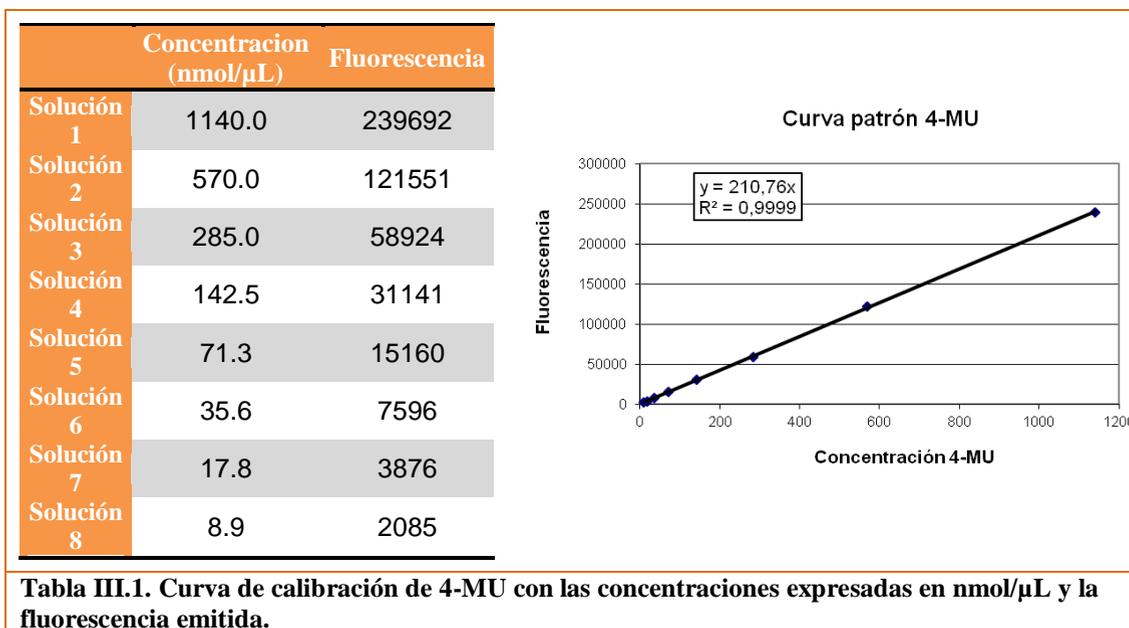
SIGMA, ref. M-1381. P.M. 176.17

Se construyó una curva de calibración que nos permita establecer la relación entre la intensidad de la fluorescencia y la actividad enzimática presente en las muestras. Para ello se partió de distintas concentraciones de una solución testigo de 4-Metilumbeliferona (4-MU), que en las reacciones era el producto fluorescente que debía formarse.

La curva testigo se requiere para calcular los resultados del ensayo por extrapolación, siendo necesario asegurarse que la fluorescencia medida en el ensayo se encuentra dentro del rango lineal de medición.

La preparación de la solución testigo a distintas concentraciones requirió la disolución de la solución madre de 4-MU en un tampón TCG (Carbonato-Glicina) a pH básico. Además, con objeto de conservar la fluorescencia del compuesto, debe evitarse disolver en agua caliente y se procuró proteger de la luz todo lo posible. Como siempre, la conservación fue en alícuotas a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Partiendo de una solución de  $1140\text{ nmol}/\mu\text{L}$  de 4-MU se realizaron diluciones seriadas al  $1/2$  con TCG, llegando hasta una concentración de  $8.9\text{ nmol}/\mu\text{L}$ . Ver Tabla III.1



### 2.2.5. Solución Stop: Etilendiamina 0.13M, pH básico

SIGMA, 195804. P.M. 133.02

Con objeto de parar la reacción enzimática una vez transcurrido el tiempo de reacción estipulado, se añadió una solución de stop de etilendiamina diclorhidrato 0.13M a pH básico que, debido a sus propiedades bioquímicas y a su alto pH, conseguía detener la actividad enzimática, y por tanto, el proceso de formación del producto fluorescente.

Tras su preparación, y antes de su uso, se conservó a 4°C en frasco de color topacio.

### 2.3. Reacción

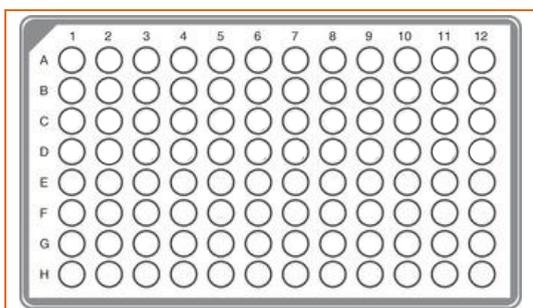


Figura III.2. Microplaca.

Disponíamos de placas de 96 pocillos de 400µL de capacidad (Microplaca GREINER BIO-ONE FIA-PLATE, BLACK, Ref. 655076), en los que tenían lugar la reacción de determinación. En cada uno de ellos colocamos, gracias a un puncher manual, un disco DBS de 1,5 mm. Posteriormente añadimos en cada pocillo lo que se indica en la figura III.3:

	Columnas 1-11 Muestra	Columna 12 Curva 4MU	Acarbosa	Buffer Ácido	Buffer Neutro	Sustrato ácido	Sustrato neutro	I N C U B A C I Ó N  24 hrs  37°C	Sol Stop	Sustr. Ácido	Sustr. neutro	L E C T U R A
Actividad Total (AαG)	A	X		X		X			X			
	B	X		X		X			X			
Actividad Inhibida (AαGIM)	C	X	X	X		X			X			
	D	X	X	X		X			X			
Act. Neutra Total (NαG)	E	X			X		X		X			
	F	X			X		X		X			
Blanco Ácido	G	X		X					X	X		
Blanco Neutro	H	X			X				X		X	

Figura III.3. Esquema de la preparación de la reacción enzimática en microplaca para determinación en DBS.

La reacción finalizó tras la adición a cada uno de los pocillos de la solución de stop de etilenamina diclorhidrato.

Se agregó a continuación a la fila G solución de sustrato en tampón ácido y a la fila H solución de sustrato en tampón neutro.

Las distintas fracciones de actividad enzimática se calcularon a partir de las filas correspondientes tal y como queda indicado en la Figura III.3

## 2.4. Proceso de lectura en microplacas

La lectura de la microplaca se realizó en un espectrofluorímetro de microplaca de longitud de onda variable Beckman Coulter, modelo DTX880. La longitud de onda de excitación fue de 355 nm y de emisión de 460 nm. El tiempo de lectura fue de 800 milisegundos.

## 2.5. Cálculos

Todas las determinaciones se realizaron por duplicado en pocillos contiguos, excepto la curva de solución testigo de 4-MU que se realizó por determinación simple.

En primer lugar se calculó la actividad ácida total ( $A\alpha G$ ) por extrapolación en la curva. La determinación de  $A\alpha G$  suele ser normal en todos los individuos, excepto en aquellos excepcionalmente patológicos, ya que incluye no sólo la actividad GAA sino también la MGA.

También por extrapolación, se calculó la actividad neutra total ( $N\alpha G$ ) cuya finalidad es informar sobre la calidad de la muestra, encontrándose reducida en las muestras de mala calidad. Y con el mismo sistema, la actividad  $\alpha$ -glucosidasa con inhibición ( $A\alpha GIM$  ó actividad ácida efectiva) que no debía ser inferior a 0.75  $\mu\text{mol/L/h}$  en los individuos sanos.

Para determinar si realmente existe patología, se calculó, así mismo, la relación  $N\alpha G/A\alpha G$  encontrándose por encima del 15% en los individuos con la enfermedad.

Se calculó además, el porcentaje de inhibición como:  $[(A\alpha G - A\alpha GIM)/ A\alpha G]$  de modo que si supera el 80% el resultado apunta a la existencia de EP.

Por último resulta de gran utilidad y muy representativo, el valor del porcentaje de actividad residual de la enzima, calculado únicamente en los individuos patológicos y que pone de manifiesto el porcentaje de actividad que presenta el individuo con respecto a un 100% teórico (con un valor de  $0.75\mu\text{mol/L/h}$ ).

## 2.6. Informe de los resultados

El informe completo de los resultados obtenidos queda representado en la Figura III.4.

	Servicio Andaluz de Salud <b>CONSEJERÍA DE SALUD</b>	<b>Servicio de Bioquímica Clínica</b> <b>Unidad de Metabolopatías</b>																					
<b>Paciente:</b> <b>Centro:</b> <b>Consulta:</b> <b>Doctor/a:</b> <b>Población:</b>																							
<b>Diagnóstico de Enfermedad de Pompe en Sangre seca recogida sobre papel (DBS).</b>																							
Análisis de la muestra de sangre impregnada en papel con nº de referencia _____ recibida en nuestro laboratorio el día 00/00/20___.																							
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 70%;"></th> <th style="text-align: center;">Resultado</th> <th style="text-align: center;">Rango Referencia</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td><math>\alpha</math>-glucosidasa a pH ácido (A<math>\alpha</math>G)</td> <td></td> <td style="text-align: center;">( 1.35 - 6.0 <math>\mu</math>mol/L/h)</td> </tr> <tr> <td><math>\alpha</math>-glucosidasa a pH neutro (N<math>\alpha</math>G)</td> <td></td> <td style="text-align: center;">( 1.50 - 17.50 <math>\mu</math>mol/L/h)</td> </tr> <tr> <td><math>\alpha</math>-glucosidasa con inhibición (A<math>\alpha</math>GIM)</td> <td></td> <td style="text-align: center;">( 0.75 - 5.0 <math>\mu</math>mol/L/h)</td> </tr> <tr> <td>Cociente N<math>\alpha</math>G/A<math>\alpha</math>GIM</td> <td></td> <td style="text-align: center;">( <math>\leq</math> 15.0 )</td> </tr> <tr> <td>% de inhibición de A<math>\alpha</math>G</td> <td></td> <td style="text-align: center;">( <math>\leq</math> 80 %)</td> </tr> <tr> <td>Actividad residual (%)</td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table>				Resultado	Rango Referencia	$\alpha$ -glucosidasa a pH ácido (A $\alpha$ G)		( 1.35 - 6.0 $\mu$ mol/L/h)	$\alpha$ -glucosidasa a pH neutro (N $\alpha$ G)		( 1.50 - 17.50 $\mu$ mol/L/h)	$\alpha$ -glucosidasa con inhibición (A $\alpha$ GIM)		( 0.75 - 5.0 $\mu$ mol/L/h)	Cociente N $\alpha$ G/A $\alpha$ GIM		( $\leq$ 15.0 )	% de inhibición de A $\alpha$ G		( $\leq$ 80 %)	Actividad residual (%)		
	Resultado	Rango Referencia																					
$\alpha$ -glucosidasa a pH ácido (A $\alpha$ G)		( 1.35 - 6.0 $\mu$ mol/L/h)																					
$\alpha$ -glucosidasa a pH neutro (N $\alpha$ G)		( 1.50 - 17.50 $\mu$ mol/L/h)																					
$\alpha$ -glucosidasa con inhibición (A $\alpha$ GIM)		( 0.75 - 5.0 $\mu$ mol/L/h)																					
Cociente N $\alpha$ G/A $\alpha$ GIM		( $\leq$ 15.0 )																					
% de inhibición de A $\alpha$ G		( $\leq$ 80 %)																					
Actividad residual (%)																							
<b>COMENTARIO DE LOS RESULTADOS:</b>																							
Sevilla, __ de _____ de 20___.																							
Fdo:																							

**Figura III.4. Informe de resultados de la actividad GAA en DBS**

## 2.7. Control de calidad de las muestras DBS

Los resultados que proporciona el laboratorio clínico deben ser exactos (veraces y precisos) para proporcionar una información clínica correcta, de modo que sean comparables con resultados anteriores/posteriores y entre distintos laboratorios.

Para estudiar la veracidad de un procedimiento de medida es necesario comparar una media de valores obtenidos con un valor supuestamente verdadero. En el laboratorio clínico pueden utilizarse valores considerados como verdaderos, principalmente de tres tipos:

- El valor asignado a un material de referencia
- El valor obtenido con un procedimiento de medida de referencia
- El valor consenso obtenido en un programa de evaluación externa de la calidad

Nuestro laboratorio participa en un programa piloto de evaluación externa de la calidad dirigido por el CDC de Atlanta: *Public Health Service - Department of Health and*



*Human Services - Centers for Disease Control and Prevention (CDC) - Newborn Screening (Quality Assurance Program) - Lysosomal Storage Disorders, Quality Control Specimen Certification.*

En este programa, aún en fase piloto, participan en torno a 50 laboratorios de todo el mundo y su objetivo es llegar a implantar un completo y definitivo programa de evaluación de la calidad centrado en las principales enfermedades lisosomales: Fabry, Gaucher, Pompe, MPS I, II y IV.

Para ello, de forma semestral, se reciben en nuestro laboratorio 3 tarjetas (correspondientes a niveles Bajo, Medio y Alto) con 15 círculos impregnados de sangre para determinar los valores de actividad enzimática correspondiente a cada una de las enfermedades lisosomales antes indicadas.

Los resultados que han de enviarse son la media aritmética y desviación estándar tanto de la fluorescencia medida como de la actividad enzimática calculada, así como el coeficiente de variación de las determinaciones (tanto de la fluorescencia como de la actividad enzimática). Es preciso indicar el rango normal considerado en nuestro laboratorio y el valor límite para la patología.

Los resultados se envían al CDC de Atlanta y en cuestión de unos meses se reciben los resultados que indican el grado de concordancia de nuestros resultados con los valores teóricos asignados y con el resto de laboratorios participantes en el proyecto.

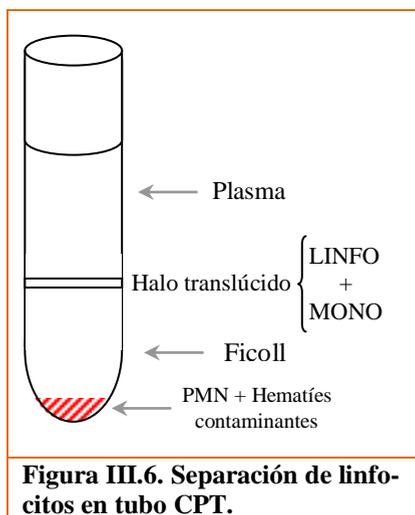
### 3. Determinación de actividad $\alpha$ -Glucosidasa ácida intralinfocitaria

La determinación tiene la misma base que la descrita en el apartado 2. *Determinación de actividad  $\alpha$ -Glucosidasa ácida en sangre seca recogida sobre papel*, sólo que en este caso el material de partida es un concentrado sonicado de linfocitos.

Al tratarse de una actividad enzimática intralinfocitaria ésta se encuentra supeditada tanto a la cantidad de linfocitos presente en la muestra como a la concentración de enzima existente en éstos. Para tener en cuenta este detalle, expresamos la actividad enzimática en función de la concentración de proteínas existente en el concentrado sonicado de linfocitos, que es preciso calcular.

#### 3.1. Toma y preparación de muestras

Al tratarse de una determinación intralinfocitaria, es necesario hacer primero una extracción de linfocitos. Así, el proceso de toma de muestra constó de dos fases: una primera fase de aislamiento de los linfocitos a partir de sangre total y una segunda fase de sonicado de los linfocitos aislados.



**Figura III.6. Separación de linfocitos en tubo CPT.**

Para el aislamiento de los linfocitos, se extrajeron 8mL de sangre total en tubos CPT de gradiente de Ficoll, con un gel separador y con heparina sódica como anticoagulante (BD Vacutainer® CPT™ ref. 362780). A continuación, centrifugamos a 3000 rpm durante 30 min a 4°C y sin freno, y el resultado fue 4 fases bien diferenciadas: una primera fase de plasma, un halo blanquecino donde se encuentran los linfocitos, seguidamente el Ficoll y por último los hematíes y los polimorfonucleares. Se recogió el suero y el halo de linfocitos y lo añadimos a un tubo Falcon de 10 mL que centrifugamos 5 minutos a 3500 rpm a 4°C y, esta vez, con freno. Tras esto, se desprecia el sobrenadante y lavamos

el pellet con agua destilada en agitación añadiendo a continuación NaCl al 1.8%, de forma que terminamos de eliminar el resto de hematíes, volviendo a centrifugar en las mismas condiciones y repitiendo los pasos de lavado un par de veces. Una vez tenemos el pellet limpio se conservan las muestras a -80°C.

Posteriormente, es necesario sonicar el aislado de linfocitos. Para ello usamos un sonicador manual Branson Digital Sonifier. Tomamos las muestras congeladas y tras re-suspender en 500  $\mu$ L de agua destilada se procedió a sonicar durante 10 segundos a una amplitud del 20% y hasta una temperatura máxima de 26°C. El resultado es una suspensión del contenido intralinfocitario donde se encuentra la enzima.

## 3.2. Reactivos

Todos los reactivos utilizados fueron de calidad analítica, proporcionados por Sigma, Merck, Mallinckrodt o similares, salvo que se indique lo contrario. En la especificación de cada uno de los materiales y métodos, queda indicada la procedencia de cada reactivo.

### 3.2.1. Tampón citrato-fosfato 0.2M, ácido y neutro

Panreac 131018.1211

Cómo en el caso anterior, se requerían un tampón ácido y uno neutro para llevar a cabo las reacciones correspondientes. En este caso, se prepararon dos tampones citrato-fosfato 0.2M a partir de soluciones de ácido cítrico (Panreac 131018.1211) y fosfato sódico (Merck 1.06580.1000), llevando luego las disoluciones a los pH's correspondientes.

La conservación se realizó en alícuotas a -20°C.

### 3.2.2. Sustrato: 4-metil-umbeliferil- $\alpha$ -D-glucopiranosido 2.8mM

SIGMA, M-9766. PM:338.3

El sustrato era un preparado que fue necesario diluir en los tampones citrato-fosfato que preparamos anteriormente. Así, para elaborar la solución ácida del sustrato, se disolvió la 4-MU- $\alpha$ -D-glucopiranosido en el tampón citrato-fosfato ácido, y para la solución neutra de sustrato se disolvió en el tampón citrato-fosfato neutro.

La conservación se realizó en alícuotas a -20°C.

### 3.2.3. Inhibidor: Acarbosa 40 $\mu$ M

SIGMA A-8980. PM: 645.61

La solución de acarbosa tiene como fin inhibir específicamente la actividad enzimática maltasa glucoamilasa (MGA)<sup>200, 201</sup> que pudiese existir en la muestra debido a la existencia de algún polimorfonuclear que hubiese escapado durante el proceso de aislamiento de linfocitos, permitiendo que la actividad  $\alpha$ -glucosidasa fuera reflejo únicamente de la GAA efectiva.

Su preparación consistió únicamente en disolver la solución madre de acarbosa, hasta una concentración de 40 $\mu$ M.

La conservación se realizó en alícuotas a -20°C.

### 3.2.4. Solución Testigo: 4-Metilumbeliferona

SIGMA, M-1381. P.M. 176.17

Se construyó una curva de calibración que nos permita establecer la relación entre la intensidad de la fluorescencia y la actividad enzimática presente en las muestras. Para ello se partió de distintas concentraciones de una solución testigo de 4-Metilumbeliferona (4-MU), que en las reacciones era el producto fluorescente que debía formarse.

La curva patrón de 4-MU construida es de preparación y resultados similares a la presentada en el apartado 2.6. *Solución Testigo: 4-Metilumbeliferona* para DBS.

### 3.2.5. Solución Stop: Tampón Carbonato-Glicina 0.17M, pH básico

SIGMA, 195804. P.M. 133.02

Con objeto de parar la reacción enzimática transcurrido el tiempo de reacción estipulado, se añadió una solución de stop consistente en un tampón Carbonato-Glicina 0.17M a pH básico que, debido a sus propiedades bioquímicas y a su alto pH, conseguía detener la actividad enzimática, y por tanto, el proceso de formación del producto fluorescente.

Tras su preparación, y antes de su uso, se conservó a 4°C en frasco de color topacio.

### 3.3. Reacción

Se realiza en las mismas placas que para el caso de las muestras DBS. Disponíamos de placas de 96 pocillos de 400  $\mu\text{L}$  de capacidad (Microplaca GREINER BIO-ONE FIA-PLATE, BLACK, Ref. 655076), en los que tenían lugar la reacción de determinación. En cada uno de éstos colocamos, 10  $\mu\text{L}$  de la solución sonicada y centrifugada. Posteriormente se procede según se indica en la Figura III. 7:

	Columnas 1-11 Muestra	Columna 12 Curva 4MU	Acarbosa	Buffer Ácido	Buffer Neutro	Sustrato ácido	Sustrato neutro	I N C U B A C I Ó N  1 hr  37°C	Sol Stop	Sustr. Ácido	Sustr. neutro	L E C T U R A	
Actividad Total (A $\alpha$ G)	A	X	X		X		X			X			
	B	X	X		X		X			X			
Actividad Inhibida (A $\alpha$ GIM)	C	X	X	X	X		X			X			
	D	X	X	X	X		X			X			
Act. Neutra Total (N $\alpha$ G)	E	X	X			X			X	X			
	F	X	X			X			X	X			
Blanco Ácido	G	X	X		X					X	X		
Blanco Neutro	H	X	X			X				X			X

**Figura III.7. Esquema de la preparación de la reacción enzimática en microplaca para la determinación de actividad intralinfocitaria.**

La reacción finalizó tras la adición a cada uno de los pocillo de la solución de stop de tampón Carbonato-Glicina.

Se agregó a continuación a la fila G, solución de sustrato en tampón ácido y a la fila H solución de sustrato en tampón neutro.

Las distintas fracciones de actividad enzimática se calcularon a partir de las filas correspondientes tal y como queda indicado en la Figura III.7.

Todas las determinaciones se realizaron por duplicado en pocillos contiguos, excepto la curva de solución testigo de 4-MU que se realizó por determinación simple.

### 3.4. Proceso de lectura en microplacas

La lectura de la microplaca se realizó en un espectrofluorímetro de microplaca de longitud de onda variable Beckman Coulter, modelo DTX880. La longitud de onda de excitación fue de 355 nm y de emisión de 460 nm. El tiempo de lectura fue de 800 milisegundos.

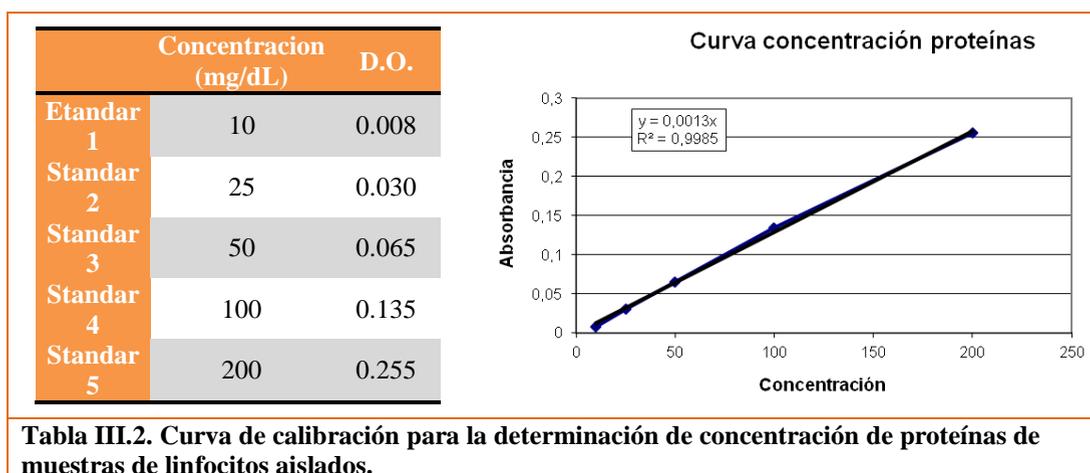
### 3.5. Determinación de proteínas intralinfocitarias

Para calcular la concentración de proteínas existente en las muestras y así expresar la actividad enzimática en función de ésta, utilizamos un método espectrofotométrico derivado del empleado por Lowry et al.<sup>322</sup>.

Partimos de linfocitos aislados de sangre total, sonicados y conservados a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Una vez descongelados, centrifugamos a 3500 rpm durante 5 minutos en centrifuga refrigerada a  $4^{\circ}\text{C}$  y usamos el sobrenadante.

Se requieren como reactivos de base: Reactivo A:  $\text{CO}_3\text{Na}_2$  al 2% en NaOH 0.1 M; Reactivo B:  $\text{SO}_4\text{Cu}\cdot 5\text{H}_2\text{O}$  al 1%; y Reactivo C: Tartrato sódico potásico al 2%. Mezclando estos 3 reactivos en el momento de realizar la determinación obtenemos el primer reactivo (Reactivo-1) de la reacción de Lowry.

Como segundo reactivo de la reacción usamos el denominado Reactivo de Folin en su formato comercial (Sigma ref. F9252).



Fue preciso preparar una curva a partir de una solución stock de albúmina de concentración 1000 mg/dL (Albumin human Sigma-Aldrich ref. A9731) para extrapolar los valores obtenidos en nuestras muestras. Los puntos de la curva se expresan en la Tabla III.2.

El procedimiento, tanto para las muestras como para la construcción de la curva consistió en colocar en tubos de al menos 4 mL de capacidad:

Muestra/Calibrador/Control:	50 $\mu$ l
Agua destilada:	450 $\mu$ l
Reactivo-1:	2500 $\mu$ l
Mezclar bien durante 10 minutos en oscuridad	
Reactivo-2:	250 $\mu$ l

El resultado es una solución con distinta intensidad de azul según la concentración de proteínas existente en la muestra.

Se procede a continuación a la lectura en el espectrofotómetro (ThermoSpectronic Genesys 10uv) a 580 nm y extrapolamos los resultados de las muestras en la curva de calibración de proteínas.

Para asegurar que el proceso se llevó a cabo de forma correcta, procesábamos simultáneamente dos Controles de Bio-Rad, UCC-1 y UCC-2(Liquichek<sup>TM</sup> 397 y 398, respectivamente).

### 3.6. Cálculos

En este caso al no existir actividad MGA en los linfocitos, la actividad enzimática estará en función de la actividad GAA ácida total presente en los linfocitos. Ésta se calcula por extrapolación de la fluorescencia obtenida a partir de la curva de 4MU.

Como hemos indicado, la actividad enzimática intralinfocitaria depende de la concentración de linfocitos en la muestra y la expresión de la enzima en estas células, por lo que el resultado final ha de quedar expresado en función de la concentración de proteínas de la muestra, también por extrapolación en su curva de calibración.

De esta forma, el resultado final quedó expresado en nmol/min/mg proteína siendo los valores normales los resultados entre 0.2 y 1.0 nmol/min/mg proteína.

### 3.7. Informe de los resultados

El informe completo de los resultados obtenidos queda representado en la Figura III.8.

		Servicio Andaluz de Salud <b>CONSEJERÍA DE SALUD</b>
		<b>Servicio de Bioquímica Clínica</b> <b>Unidad de Metabolopatías</b>
<b>Paciente:</b> <b>Centro:</b> <b>Consulta:</b> <b>Doctor/a:</b> <b>Población:</b>		
<b>Diagnóstico de Enfermedad de Pompe en Linfocitos.</b>		
Los análisis realizados en la muestra de sangre total con nº de referencia _____, recibida en nuestro Laboratorio el día --/--/-- tuvieron los siguientes resultados:		
Paciente	Enzima	Actividad $\alpha$ -Glucosidasa ácida total en linfocitos
X	$\alpha$ -Glucosidasa	Y nmol/min/mg proteína
	Valores de referencia	0.2 – 1.0 nmol/min/mg proteína
<b>COMENTARIO DE LOS RESULTADOS:</b>		
Sevilla, __ de _____ de 20___.		
Fdo:		

**Figura III.8. Informe de resultados de la actividad GAA intralinfocitaria**

## 4. Determinación de los niveles de Glucosa tetrasacárido en orina

Se han desarrollado diferentes metodologías para la determinación de la Glc4 incluyendo inmunoensayos, cromatografía de afinidad con anticuerpos frente a Glc4, cromatografía líquida de alta resolución con detección ultravioleta o electroquímica (HPLC/UV-ED) o bien cromatografía gaseosa/líquida con detección mediante espectrometría de masas<sup>188, 323, 324, 327-330</sup>.

Nosotros hemos llevado a cabo una modificación en la metodología de HPLC/UV descrita por An Y et al<sup>188</sup> que presenta la ventaja de precisar un menor tiempo de desarrollo cromatográfico para la cuantificación de la Glc4 urinaria.

### 4.1. Materiales e instrumentación

Glucosa tetrasacárido (Glc4), Lactosa, Maltosa, Glucosa, Manosa y Celopentaosa (estándar interno), componentes del calibrador, procedentes de Sigma-Aldrich.

N-butyl-4-aminobenzoato, Cianoborohidruro sódico, Ácido acético glacial y Metanol LiChrosolv, como productos usados en el proceso de derivatización, suministrados por Merck KGaA.

Tetrabutilamonio cloruro y Acetonitrilo LiChrosolv, constituyentes de los solventes de la fase móvil suministrados igualmente por Merck KGaA.

Los cartuchos LiChrolut RP-18 (40-63  $\mu\text{m}$ ) 100 mg usados en la preparación de las muestras, procedían de la casa VWR y la columna Synergi 4 $\mu\text{m}$  Hydro-RT 80 (Phenomenex®) 250x4.6 mm utilizada como fase estacionaria en el procedimiento analítico, de la casa Jasco.

El procedimiento cromatográfico de HPLC/UV se llevó a cabo en un equipo modular Agilent 1100 dotado de inyector automático de las muestras.

## 4.2. Toma y preparación de muestras

Las muestras de orina se recogieron durante un periodo de 24 horas, y se conservaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta la determinación analítica.

La determinación de los oligosacáridos de glucosa mediante cromatografía líquida requiere un proceso previo de derivatización de las muestras, en nuestro caso realizado según el método de Poulter y Burlingame modificado<sup>331</sup>. Este proceso, que se realiza mediante el uso de N-butil-4-aminobenzoato (BAB), presenta las ventajas de su especificidad, sensibilidad, reproductibilidad y alta resolución. Además, su simpleza y bajo coste posibilitan su utilización en los laboratorios clínicos.

La derivatización de muestras y calibradores se realiza del siguiente modo:

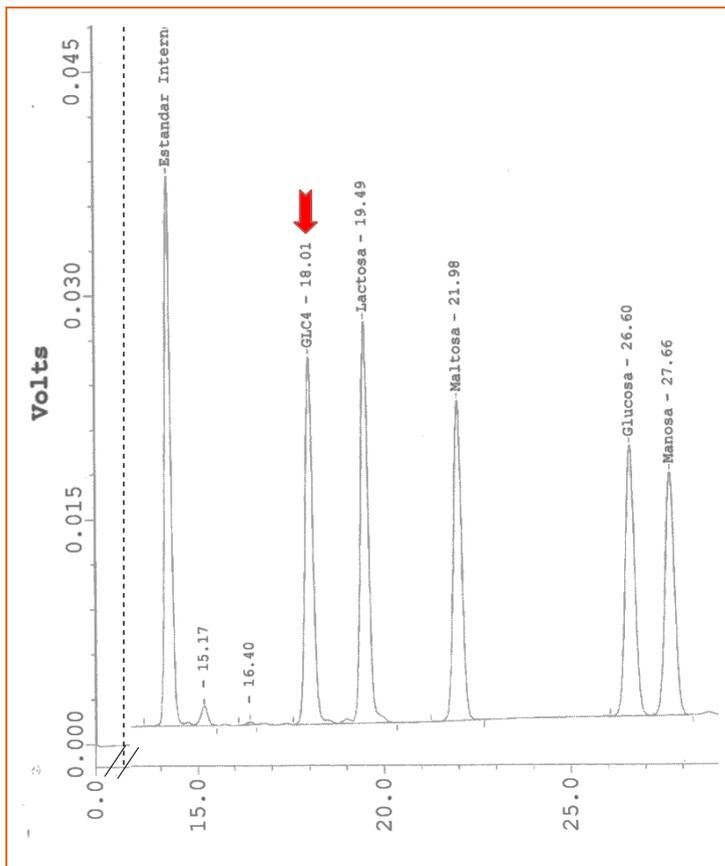
- 50  $\mu\text{L}$  de orina/calibrador.
- 10  $\mu\text{L}$  de Solución del Estándar Interno (1.2 mmol).
- 140  $\mu\text{L}$  de Reactivo de derivatización (preparado diariamente a base de N-bil-4aminobenzoato, cianoborohidruro sódico, ácido acético y metanol).
- Se procede a continuación a incubar en vial tapado en un termobloque a  $80^{\circ}\text{C}$  durante 45 minutos.
- Después de enfriar en baño de agua, las muestras/calibradores se diluyen mediante la adición de 900  $\mu\text{L}$  de una mezcla de acetonitrilo/agua (15/85 v/v).

La fase de extracción de muestras/calibradores se lleva a cabo mediante cartuchos LiChrolut® RP-18 (40-63  $\mu\text{m}$ ) 100 mg previamente acondicionados por la adición de Metanol seguido de agua destilada.

Los oligosacáridos derivatizados, procedentes de las muestras/calibradores añadidos a los cartuchos, son lavados con la mezcla acetonitrilo/agua (15/85 v/v) y eluidos finalmente mediante la adición de una mezcla acetonitrilo/agua (30/70).

El eluido está ya preparado para inyectar directamente en el sistema de HPLC.

### 4.3. Análisis y cuantificación mediante HPLC



**Figura III.9.**  
Ejemplo de cromatograma con altas concentraciones de Glc4.

Los oligosacáridos derivatizados son separados en una columna Synergi 4 $\mu$ m Hydro-RT 80 250x4.6mm con un flujo de 0.9 ml/min. y detección UV a 304 nm durante un tiempo de 40 minutos.

La fase móvil estuvo formada por:

- Sol. A. Tetrabutilamonio cloruro 10 mM en Acetonitrilo/Agua 20/80 v/v.
- Sol. B. Acetonitrilo puro.

Se utilizó un procedimiento de separación en gradiente durante 40 minutos.

Las áreas de los picos de Glc4 y estándar interno (Cellopentaosa) se calculan automáticamente con corrección de la línea base, usando la ratio de ambas áreas para la cuantificación de la Glc4.

#### 4.4. Informe de los resultados



Servicio Andaluz de Salud  
CONSEJERÍA DE SALUD

Servicio de Bioquímica Clínica  
Unidad de Metabolopatías

Paciente:  
Centro:  
Consulta:  
Doctor/a:  
Población:

#### Determinación de Glucosa tetrasacárido para el diagnóstico de la Enfermedad de Pompe.

En la muestra de Orina con nº de referencia \_\_\_\_\_ recibida en nuestro laboratorio el día --/--/---- se obtuvieron los siguientes resultados:

Paciente	Fecha de nacimiento	Glc4 mmol/mol creat.	Valores normales
X	--/--/----	Y	0.30 – 1.0

#### COMENTARIO DE LOS RESULTADOS:

Sevilla, \_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_.

Fdo:

Figura III.10. Informe de resultados de la concentración de Glc4 en orina de 24 horas.

## 5. Estudio molecular para la mutación IVS1-13T>G

La mutación IVS1-13T>G es la más común en Europa encontrándose en más de la mitad de los pacientes de raza blanca<sup>80</sup>. Es una mutación típica de la variedad del adulto, de hecho, el 71% de los pacientes heterocigotos compuestos con ésta variedad de la enfermedad la presentan.

Se trata de una transversión de Timina a Guanina en la posición -13 del sitio aceptor del intrón 1 del gen, originando splicings alternativos<sup>60</sup>, que dan lugar a transcritos aberrantes en los que queda suprimido el primer exón codificante, el exón 2; y transcritos completos ( $\approx 10\%$ )<sup>83, 84</sup> con la información adecuada para producir la enzima funcional<sup>85</sup>.

En consecuencia, nos planteamos que sería de gran interés desarrollar un sistema de análisis molecular para detectar la presencia de la mutación a través de una reacción de PCR a tiempo real que nos permitiera identificar de forma rápida y sencilla a los pacientes que portan esta mutación.

Asimismo pensamos, que desarrollando un sistema de extracción del ADN a partir de las muestras de DBS contribuiríamos de forma muy importante a la mejora del proceso diagnóstico, proporcionando un sistema eficiente, de calidad, y sobre todo, de mayor comodidad para clínicos y pacientes, que proporcionara un diagnóstico completo (hasta el nivel molecular) de la enfermedad de Pompe.

### 5.1. Aislamiento del ADN

El aislamiento de ADN se realizó tanto a partir de las muestras de sangre total (con EDTA como anticoagulante) como de muestras DBS, recibidas para realizar el análisis de actividad enzimática. De esta forma pusimos a punto la técnica de detección de la mutación para ambos tipos de muestras.

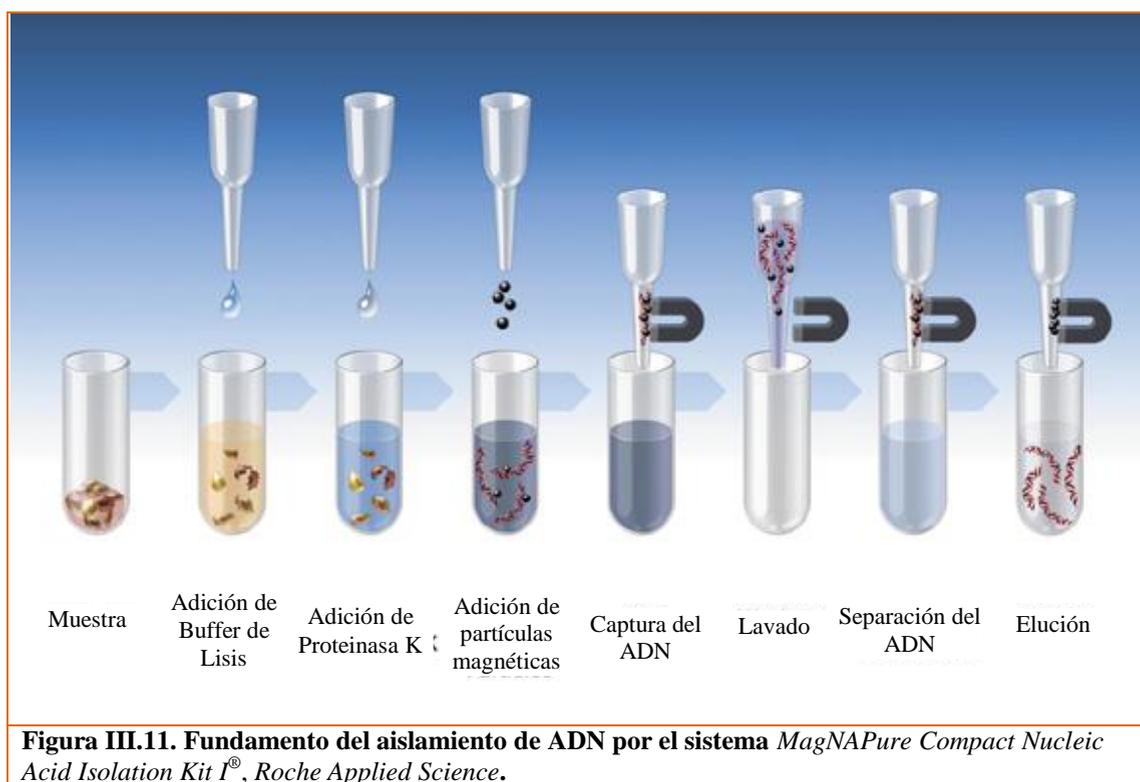
En lo referente a la sangre seca, el primer paso fue cortar seis discos DBS de 3 mm de diámetro y colocarlos en tubos de ensayo de 5 mL junto con 400  $\mu\text{L}$  de agua destilada, y dejarlos en agitación en un baño termostatzado a 56°C durante 2 horas.

Tras este paso, centrifugamos y extraemos el sobrenadante del cual haremos la extracción propiamente dicha. A partir de este paso el proceso es común tanto para DBS como para sangre total, de forma que se procede a la extracción utilizando *MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I*<sup>®</sup>, Roche Applied Science, Indianápolis, USA; eluyendo en un volumen final de 200  $\mu\text{L}$  de tampón de elución.

El *MagNA Pure Compact*<sup>®</sup> es un sistema de extracción basado en el uso de partículas magnéticas que permite el aislamiento rápido y automatizado de ácidos nucleicos (ADN, ARNt, ARNm).

El ácido nucleico obtenido debía ser altamente puro y fue el que usamos para llevar a cabo la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) a tiempo real.

El fundamento, así como las etapas del proceso de aislamiento de ácidos nucleicos, se representa en la Figura III.11.



Las etapas en las que consta el aislamiento de los ácidos nucleicos son: 1) 400  $\mu$ L de muestra eluída del DBS o 400  $\mu$ L de muestra de sangre total. 2 y 3) Lisis celular y degradación de proteínas mediante el buffer de lisis, que contiene sales caotrópicas, y proteinasa K, respectivamente. 4) Unión del ADN a la superficie de las partículas magnéticas. 5) Las partículas magnéticas son recogidas gracias a un imán. 6) Eliminación de desechos celulares mediante lavados. 7) Las partículas magnéticas son separadas del buffer de lavado que contiene las impurezas. 8) Elución de los ácidos nucleicos durante la eliminación de las partículas magnéticas.

## 5.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real e identificación de la mutación IVS1-13T>G

El análisis molecular se llevó a cabo mediante PCR a tiempo real, método enzimático de síntesis *in vitro* de múltiples copias de una secuencia específica de ADN que fue desarrollada por Mullis a mediados de los años 80<sup>332</sup>. En dicha reacción se requiere el uso de cebadores o *primers* (pequeños fragmentos de ADN capaces de unirse a secuencias complementarias específicas que limitan la región que queremos amplificar), nucleótidos y la presencia de la enzima Taq- polimerasa (purificada a partir de la bacteria *Thermus aquaticus*)<sup>333</sup> que cataliza la síntesis de la cadena complementaria del ADN molde de cadena sencilla. Además, en el caso de la PCR a tiempo real se adiciona un compuesto (sonda) marcado con un fluoróforo que en el termociclador, dotado con sensores de medida de fluorescencia, y tras excitar el fluoróforo a una longitud de onda apropiada, nos permite medir la tasa de generación de uno o más productos específicos. Dicha medición, se realiza tras cada ciclo de amplificación, de ahí su nombre.

La PCR se basa en un ciclo repetido consistente en tres pasos (Figura III.12):

- Desnaturalización del ADN de doble cadena (94-95°C)
- Hibridación o *annealing* del cebador en el extremo específico 3' del ADN molde
- Elongación o extensión del cebador por acción de la ADN polimerasa en dirección 5' → 3' (temperatura óptima de actividad de Taq-polimerasa 72°C).

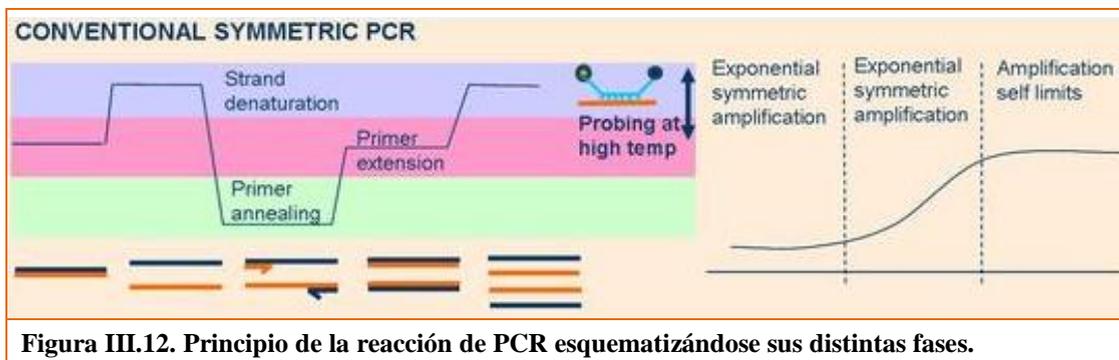
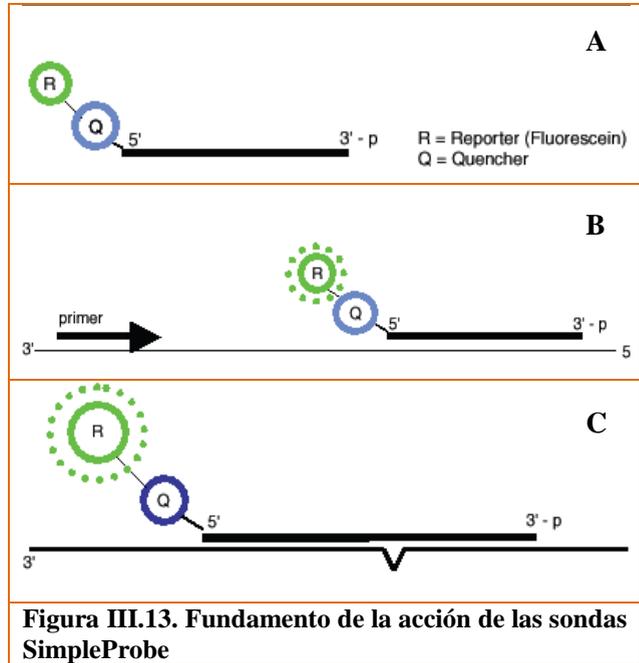


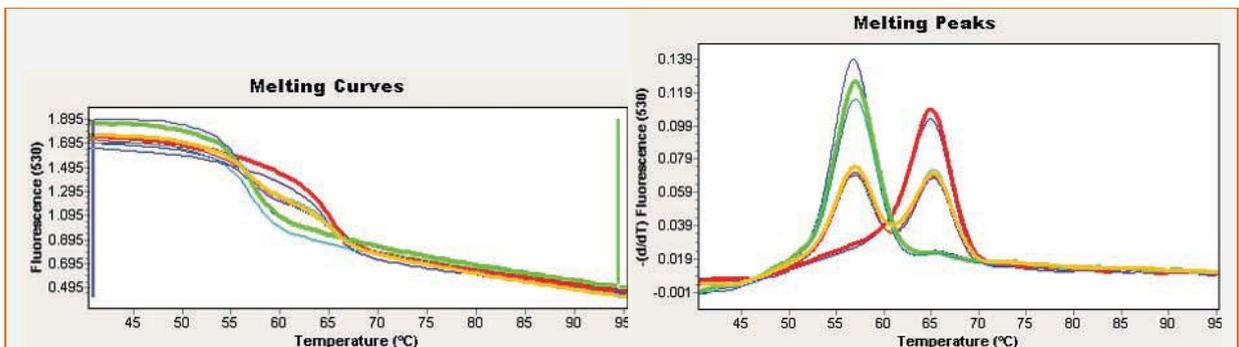
Figura III.12. Principio de la reacción de PCR esquematizándose sus distintas fases.

En nuestra reacción de PCR a tiempo real utilizamos un sistema SimpleProbe para la monitorización. Las sondas SimpleProbe son un tipo especial de sonda de hibridación que permite detectar las mutaciones y SNPs (polimorfismos de nucleótido único). Este formato sólo requiere una sonda de hibridación, marcada con un solo fluoróforo, para lograr la especificidad de secuencia. Generalmente, su sonda está diseñada para hibridar específicamente con una secuencia diana que contiene el SNP de interés. Una vez que hibrida con su secuencia diana, la sonda SimpleProbe emite mayor fluorescencia que cuando no hibrida. Como resultado, los cambios en la fluorescencia son resultado únicamente del estado de hibridación de la sonda.

La sonda SimpleProbe está constituida por un *quencher* y un fluoróforo, en este caso fluoresceína. Cuando se encuentra libre en solución, la emisión de fluorescencia se encuentra inhibida por un procedimiento específico mediado por el *quencher* no fluorescente (situación A). Cuando la sonda hibrida con su diana, la inhibición se reduce y al ser excitado por el LED del LightCycler emite fluorescencia verde (situación B).



Mediante la medición de la fluorescencia, el instrumento detecta el nivel de hibridación de la sonda y su diana al aumentar la temperatura, de forma que, cuanto más estable es la hibridación mayor es la temperatura de fusión. Las mutaciones, aunque sean de un único par de bases, debilitan la estabilidad de la unión de la sonda SimpleProbe.



**Figura III.14. Resultados de la PCR a tiempo real.**

El gráfico de la izquierda muestra la fluorescencia de la muestra frente a la temperatura (curva melting). En cada muestra, la fluorescencia de la señal disminuye claramente a medida que aumenta la temperatura, lo que refleja la extinción de la señal de la sonda SimpleProbe a medida que la sonda se separa de su diana.

El gráfico derecho muestra la primera derivada negativa de la fluorescencia de la muestra frente a la temperatura, representando la temperatura de fusión de cada muestra como un pico. En este ejemplo, el ensayo puede diferenciar claramente las muestras de tipo salvaje (los picos más altos de fusión que reflejan una combinación perfecta entre la secuencia diana y la sonda) de las muestras de mutantes (menores picos de fusión que reflejan los desajustes entre el objetivo y la secuencia de la sonda).

En nuestro caso utilizamos dos sondas SimpleProbe, una para la detección de los individuos silvestres (con timina en la posición correspondiente) y otra para aquellos que presenten la mutación IVS1-13 T>G (con guanina en la posición que debería ocupar la timina). El objetivo de experimentar con dos sondas distintas fue conseguir determinar cuál de ellas nos reportaba mejores resultados a la hora de diferenciar entre individuos silvestres y mutantes.

Los estudios moleculares se llevaron a cabo en el equipo de PCR a tiempo real Light Cycler® 480, Roche Applied Science, Indianápolis, USA.

Los primers de partida para la amplificación fueron:

PRIMERS	SECUENCIA 5' → 3'
<b>Forward (gsd_F).</b>	
<b>TIBMOL</b>	TTCCTGGGGACATTCTAAGCGT
(Ref. 1142688)	
<b>Reverse (gsd_a).</b>	
<b>TIBMOL</b>	GGAGATGACCTGGACAGCTCCTACA
(Ref. 1142670)	

Se procedió a la preparación de la reacción de PCR del siguiente modo:

COMPONENTE	VOLUMEN
Hyb Master 5X	4 µL
H <sub>2</sub> O destilada	9 µL
gsd F (5 µM)	1 µL
gsd R (20 µM)	1 µL
Sonda SimpleProbe [T] (0.5 µM)/ /Sonda SimpleProbe [G] (0.5 µM)	2 µL
ADN	3 µL
<b>Vol. Total</b>	<b>20µL</b>

El protocolo del proceso de PCR a tiempo real de nuestro estudio, se llevó a cabo con las siguientes condiciones:

- 1- Un ciclo de preincubación: Activación previa de la Taq-polimerasa (95°C).
- 2- 45 ciclos de amplificación para sangre total y 60 ciclos para DBS:
  - Desnaturalización (95°C) se separan las 2 hebras de ADN.
  - Hibridación o *annealing* (60°C) hibridación de los *primers* a su secuencia complementaria.
  - Elongación (72°C) extensión de los *primers* mediante la ADN polimerasa utilizando ADN diana como molde.
- 3- Un ciclo de disociación con incremento de temperatura de 20°C/segundo cada 20 segundos.

El análisis de los resultados se realiza mediante examen de las respectivas curvas de *melting*, dado que las secuencias silvestre y mutante presentarán diferentes temperaturas de *melting*, permitiendo diferenciar a los individuos homocigotos silvestres, homocigotos mutantes o heterocigotos.



# RESULTADOS



## IV. RESULTADOS

Con el fin de alcanzar los objetivos planteados, y utilizando la población, las muestras y la metodología experimental detallada en el capítulo anterior, se realizaron una serie de experimentos para evaluar la importancia que representa el papel del laboratorio clínico en el diagnóstico de la enfermedad de Pompe cuyos resultados se detallan a continuación.

### **1. Resultados de la revisión bibliográfica que presenta los principales puntos de conocimiento sobre el contexto, diagnóstico y tratamiento de la enfermedad de Pompe**

El primer objetivo que nos marcamos en el desarrollo de esta Tesis consistía en *contribuir a la actualización de información sobre la enfermedad de Pompe a través de una extensa revisión bibliográfica que presente los principales puntos de conocimiento sobre el contexto, diagnóstico y tratamiento de la enfermedad*. Este objetivo responde, entre otras consideraciones, a los planteamientos expuestos por el *Plan Andaluz de Atención a Personas Afectadas por Enfermedades Raras* en el cual se detallan varias acciones de carácter prioritario para alcanzar los fines propios del Plan, entre las que destaca: *Mejorar la gestión de conocimientos sobre las enfermedades raras, la formación de los profesionales y la investigación*.

Los esfuerzos para alcanzar el objetivo marcado (primer punto de la sección *II. OBJETIVOS*, citado en el párrafo anterior) en relación a lo expuesto en el *Plan Andaluz de Atención a Personas Afectadas por Enfermedades Raras* (también expuesto en el párrafo precedente), quedan reflejados en la amplia introducción que precede al resto del trabajo de Tesis que se presenta (sección *I. INTRODUCCIÓN*). Por ello creemos que resulta interesante hacer esta consideración en el primer punto tratado en la sección de *RESULTADOS* de la presente Tesis.

## 2. Determinación de actividad $\alpha$ -glucosidasa ácida en DBS para el diagnóstico de la enfermedad de Pompe

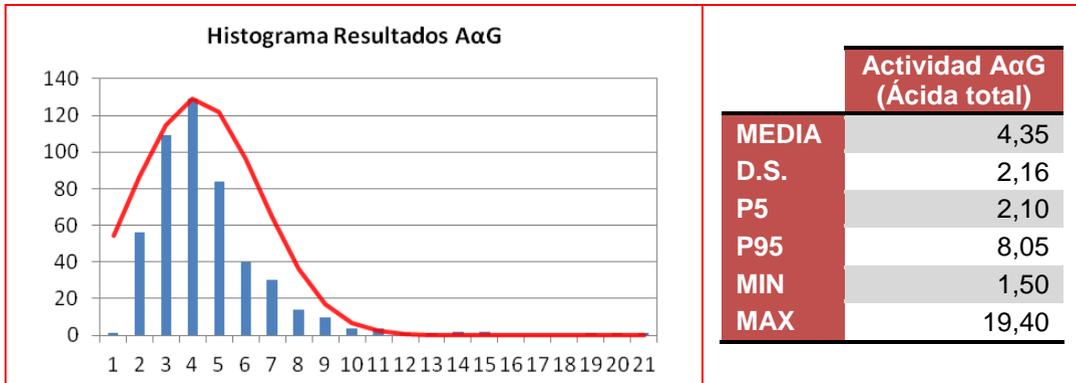
En el diagnóstico bioquímico de la enfermedad de Pompe el primer paso consiste en la determinación de la actividad GAA en sangre seca recogida sobre papel (DBS). Analizaremos en este apartado los resultados obtenidos en nuestro laboratorio para este tipo de muestras a lo largo del año 2011, examinando los valores obtenidos en todos los pacientes estudiados durante este periodo, así como las conclusiones que podemos extraer gracias a nuestra participación en el programa externo de la calidad para este tipo de muestras dirigido por el CDC de Atlanta y en el que participa nuestro laboratorio.

### 2.1. Resultados de la actividad GAA en DBS de la población estudiada.

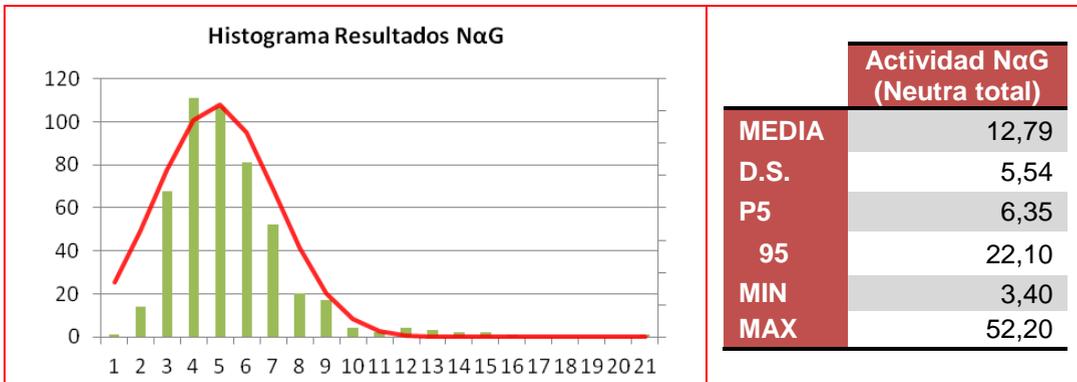
Desde el 1/1/2011 hasta el 31/12/2011 llegaron a nuestro laboratorio 530 muestras de DBS de pacientes con sospecha de padecer enfermedad de Pompe, a los que se le realizaron las determinaciones de actividad enzimática GAA en DBS en sus distintas formas (A $\alpha$ G - *Actividad ácida total*, N $\alpha$ G - *Actividad neutra total*, A $\alpha$ GIM - *Actividad ácida inhibida* o Actividad efectiva) y con sus diferentes cocientes (Cociente N $\alpha$ G/A $\alpha$ GIM y Porcentaje de inhibición de A $\alpha$ G).

A raíz del análisis de éstos resultados, podemos extraer conclusiones interesantes que arrojen luz sobre la idoneidad de la metodología empleada en nuestro laboratorio.

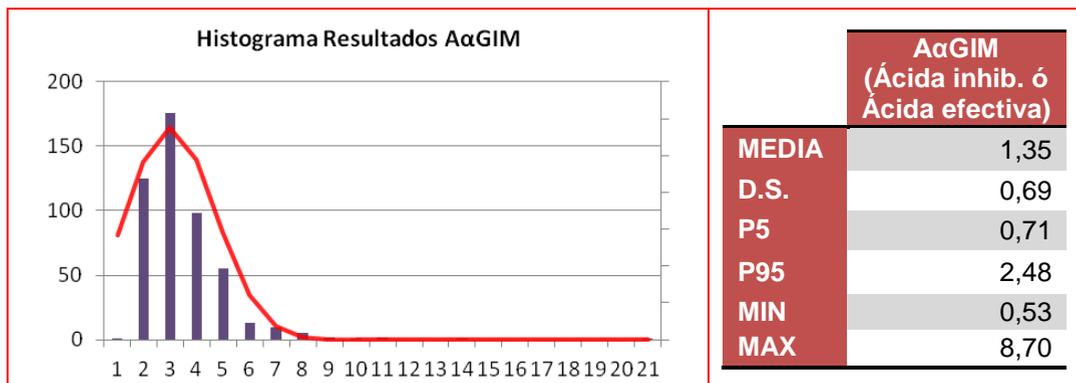
La descripción estadística de los resultados de individuos sin la patología (488 pacientes) se muestran en las Tablas IV.1-IV.5, acompañadas de los histogramas que demuestran, junto con la realización del test estadístico de normalidad de Kolmogorov-Smirnov, que la colección de valores obtenidos sigue en todos ellos una distribución normal con la típica campana de Gauss.



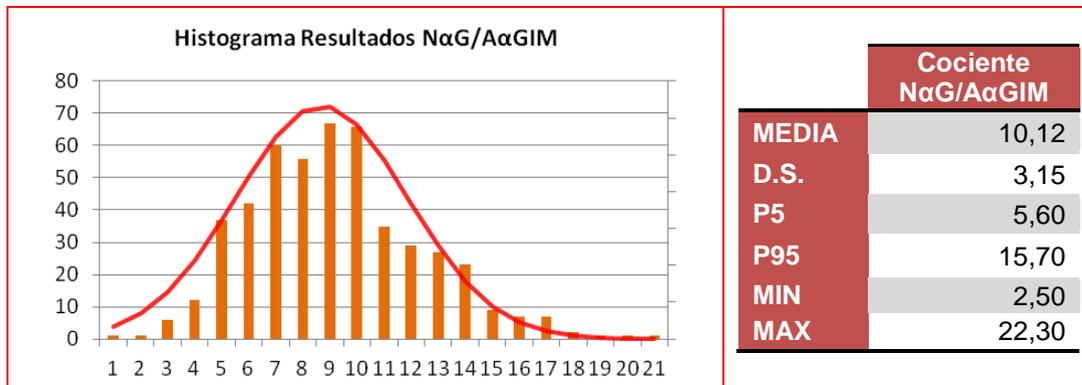
**Tabla IV.1.** Descripción estadística de los resultados obtenidos para la actividad ácida total (AαG) en la población de muestras DBS que se encontraban en los rangos de normalidad. Las actividades enzimáticas están expresadas en  $\mu\text{mol/L/h}$ . El histograma refleja el resultado del test estadístico de normalidad de Kolmogorov-Smirnov que confirma que los resultados siguen una distribución normal ( $p < 0,05$ ).



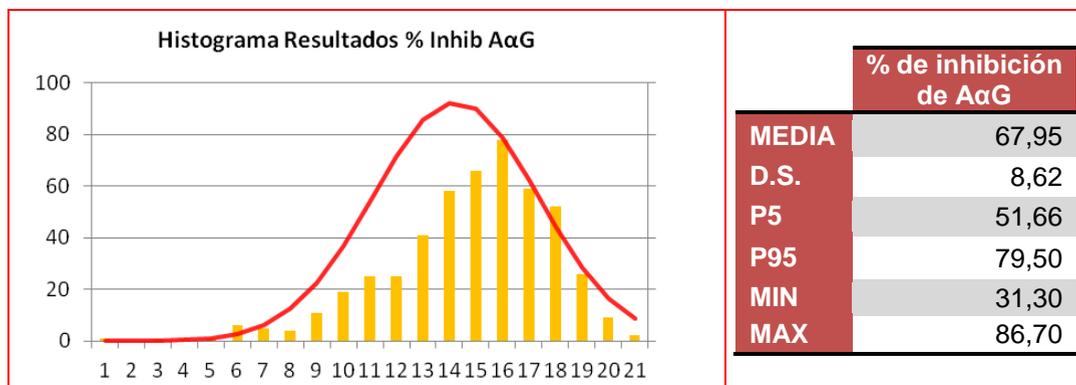
**Tabla IV.2.** Descripción estadística de los resultados obtenidos para la actividad neutra total (NαG) en la población de muestras DBS que se encontraban en los rangos de normalidad. Las actividades enzimáticas están expresadas en  $\mu\text{mol/L/h}$ . El histograma refleja el resultado del test estadístico de normalidad de Kolmogorov-Smirnov que confirma que los resultados siguen una distribución normal ( $p < 0,05$ ).



**Tabla IV.3.** Descripción estadística de los resultados obtenidos para la actividad ácida inhibida (AαGIM) en la población de muestras DBS que se encontraban en los rangos de normalidad. Las actividades enzimáticas están expresadas en  $\mu\text{mol/L/h}$ . El histograma refleja el resultado del test estadístico de normalidad de Kolmogorov-Smirnov que confirma que los resultados siguen una distribución normal ( $p < 0,05$ ).



**Tabla IV.4.** Descripción estadística de los resultados obtenidos para el cociente de actividades neutra total e inhibida (NαG/ AαGIM) en la población de muestras DBS que se encontraban en los rangos de normalidad. El histograma refleja el resultado del test estadístico de normalidad de Kolmogorov-Smirnov que confirma que los resultados siguen una distribución normal ( $p < 0,05$ ).



**Tabla IV.5.** Descripción estadística de los resultados obtenidos para el porcentaje de inhibición de la actividad ácida total en la población de muestras DBS que se encontraban en los rangos de normalidad. Los resultados están expresados en tanto por ciento. El histograma refleja el resultado del test estadístico de normalidad de Kolmogorov-Smirnov que confirma que los resultados siguen una distribución normal ( $p < 0,05$ ).

En el caso de los valores fuera de los rangos de la normalidad (42 pacientes), mostramos en la Tabla IV.6 la descripción estadística, no representando en este caso histograma por no tratarse ésta de una colección de valores que siga una distribución normal.

	MEDIA	D.S.	P5	P95	MIN	MAX
A $\alpha$ G (Ácida total)	3,12	1,08	1,31	4,90	0,84	5,90
NaG (Neutra total)	12,68	3,80	8,31	0,75	7,40	21,50
A $\alpha$ GIM (Ácida inhibida)	0,42	0,20	0,17	0,75	0,14	0,87
Cociente NaG/A $\alpha$ GIM	38,59	24,64	15,90	89,51	15,10	100,20
% de inhibición de A $\alpha$ G	85,12	7,38	75,99	94,98	58,20	95,30

**Tabla IV.6.** Descripción estadística de los resultados obtenidos en la población de muestras DBS que se encontraban fuera de los rangos de normalidad.

Las actividades enzimáticas están expresadas en  $\mu\text{mol/L/h}$

## **2.2. Estudio de la veracidad de la determinación de actividad GAA en DBS mediante la participación en programas de evaluación externa de la calidad.**

El control externo de la calidad abarca diferentes actividades orientadas a la evaluación de la exactitud de los resultados mediante la intervención de una organización ajena al laboratorio. La forma más común de control externo de la calidad son las comparaciones entre laboratorios o programas de evaluación externa de la calidad.

Estos programas son organizados por asociaciones profesionales, organismos oficiales (como el CDC de Atlanta) o por fabricantes de materiales de control. Aunque existen diferencias operativas, todos los programas tienen un fundamento similar. Los laboratorios participantes miden alguna magnitud de un material de control, de valor desconocido, la organización del programa recopila los resultados de los laboratorios y realiza un estudio de los datos que remite luego a cada laboratorio participante, informándole sobre el error de su resultado.

En los programas externos se compara el resultado obtenido en el laboratorio con un valor asignado para estimar el error cometido. El valor asignado es un valor convencionalmente verdadero y puede obtenerse de varias formas, aunque la más frecuente es calculando el valor de consenso, que es la media de resultados de todos los laboratorios participantes que utilizan el mismo método de medida.

En nuestro caso, nuestro laboratorio forma parte de un *programa piloto* de evaluación externa de la calidad dirigido por el CDC de Atlanta, y mediante la participación en él pretendemos verificar la buena praxis respecto a la determinación de la actividad GAA para muestras DBS. Realizaremos esta comprobación mediante la comparación de los resultados obtenidos en nuestras determinaciones, partiendo del material aportado por este programa, y el cálculo de los errores que nos permitan estudiar la veracidad de nuestros resultados.

Las determinaciones se llevaron a cabo a partir de las muestras aportadas por el CDC de Atlanta, correspondiendo estas muestras DBS a los niveles bajo, medio y alto de la actividad enzimática estudiada. Se realizaron dos envíos anuales con sus correspondientes resultados.

Los valores obtenidos por nuestro laboratorio durante su participación en el programa del 2011, en comparación con los resultados aportados por la organización responsable del mismo, se expresan en la Tabla IV.7.

		RESULTADOS DE NUESTRO LABORATORIO								
		MEDIA DE VALORES OBTENIDOS*					$\bar{x}$	D.S.	CV <sub>1</sub>	CV <sub>2</sub>
1 <sup>er</sup> SET	Nivel Bajo	1,02	1,02	1,01	0,99	1,07	1,01	0,05	0,04	0,05
	Nivel Medio	4,96	4,77	4,67	4,81	4,94	4,83	0,16	0,03	0,03
	Nivel Alto	7,49	7,41	7,47	7,80	7,79	7,59	0,24	0,02	0,03
2 <sup>o</sup> SET	Nivel Bajo	0,65	0,59	0,60	0,58	0,57	0,60	0,03	0,01	0,05
	Nivel Medio	5,22	5,30	5,33	5,18	5,25	5,26	0,12	0,02	0,02
	Nivel Alto	10,13	9,52	10,31	9,71	9,94	9,92	0,31	0,01	0,03

**Tabla IV.7.** Las mediciones de cada set se realizaron por duplicado durante 5 días consecutivos.

\*En la Tabla se muestra la media de los valores obtenidos cada día.

Los resultados enviados al CDC fueron la Media, Desviación típica y Coeficientes de variación (CV<sub>1</sub> – C.V. intraensayo, CV<sub>2</sub> – C.V. interensayo) calculados a partir de las determinaciones.

La Tabla IV.8. muestra el resultado de la comparación entre nuestros valores y los aportados por el programa como verdaderos.

		MEDIA DE VALORES OBTENIDOS POR NUESTRO LABORATORIO	RESULTADOS CONVENCIONALMENTE VERDADEROS		CÁLCULO DE ERRORES	
			Media asignada	Intervalo de error permitido	Error cometido	Error permitido
1 <sup>ER</sup> SET	Nivel Bajo	1,02	1.13	0.90 – 1.36	-0,10	± 0,23
	Nivel Medio	4,83	5.29	3.91 – 6.67	-0,08	± 1,38
	Nivel Alto	7,59	10.23	6.60 – 13.86	-0,26	± 3,63
2 <sup>o</sup> SET	Nivel Bajo	0,60	0.75	0.47 – 1.02	-0,20	± 0,27
	Nivel Medio	5,26	5.42	4.22 – 6.62	-0,03	± 1,20
	Nivel Alto	9,92	10.14	7.39 – 12.89	-0,02	± 2,75

**Tabla IV.8.** Comparativa entre los valores obtenidos por nuestro laboratorio y los convencionalmente verdaderos aportados por el CDC para cada uno de los envíos. Se muestran también los índices de error siendo éstos positivos o negativos según queden por encima o por debajo de la media.

En estos programas, la organización aporta un resultado único y un intervalo correspondiente a los valores que se encuentran dentro de los límites del error permitido (el error permitido en cada caso queda reflejado en la Tabla IV.8). El valor proporcionado por cada laboratorio participante debe tener un error inferior al permitido y por tanto encontrarse dentro del intervalo de valores acreditado.

El error relativo de nuestras determinaciones respecto al valor convencionalmente verdadero aportado por la organización se calcula como:

$$\text{Error relativo cometido} = \frac{\text{Resultado} - \text{Valor consenso}}{\text{Valor consenso}}$$

Como hemos indicado, este error relativo no puede superar al error permitido, condición que se cumple para nuestros resultados (Tabla IV.8).

Podemos concluir por tanto, que los resultados obtenidos certifican que cumplimos los criterios de calidad estipulados para esta metodología, y que dicha calidad se mantiene a lo largo del año.

### **3. Resultados de actividad $\alpha$ -glucosidasa ácida intralinfocitaria para el diagnóstico de la enfermedad de Pompe**

El segundo paso, y quizás el más relevante, en el diagnóstico bioquímico de la enfermedad de Pompe es la determinación de la actividad GAA intralinfocitaria. Analizaremos en este apartado los resultados obtenidos en nuestro laboratorio para este tipo de muestras a lo largo del año 2011, examinando los valores de todos los pacientes estudiados durante este periodo.

Tradicionalmente, la actividad intralinfocitaria ha sido necesaria para la confirmación de la deficiencia enzimática, ya que en estas células no se expresan actividades enzimáticas que realizan la misma reacción catalítica que la GAA e interfieren en el estudio, como puede ser la maltasa glucoamilasa (MGA) presente en neutrófilos, pero no en linfocitos.

Además, recientemente, la acarbosa se ha incorporado a este tipo de ensayos para inhibir selectivamente la actividad MGA, de modo que con el uso de linfocitos y este inhibidor nos encontramos en disposición de cuantificar la actividad enzimática con las mínimas interferencias, de forma que la determinación de GAA intralinfocitaria ha pasado a considerarse por muchos autores como el gold standard para el diagnóstico de la enfermedad de Pompe.

A lo largo del año 2011, a todas las determinaciones que presentaban valores de actividad GAA en DBS (en cualquiera de sus fracciones) fuera de los rangos de normalidad establecidos, se les realizaba a continuación la determinación intralinfocitaria para confirmar que realmente se trataba de un paciente afecto de la enfermedad.

A raíz del análisis de éstos resultados, podemos obtener información interesante que nos permitan extraer conclusiones útiles.

En total se realizaron 35 determinaciones de actividad intralinfocitaria. Los resultados pueden observarse en la Tabla IV.9.

NIVELES DE ACTIVIDAD GAA INTRALINFOCITARIA		
Muestras	Resultados (nmol/min/mg proteína)	Valores Normales
1	0,008	0,2 – 1,0 nmol/min/mg proteína
2	0,04	
3	0,09	
4	1,4	
5	1,09	
6	0,01	
7	0,02	
8	0,08	
9	1,01	
10	0,004	
11	1,6	
12	1,9	
13	2,02	
14	0,001	
15	0,066	
16	1,06	
17	0,02	
18	0,03	
19	0,006	
20	1,12	
21	1,16	
22	1,02	
23	0,04	
24	0,06	
25	1,1	
26	0,07	
27	1,28	
28	1,4	
29	1,06	
30	1,06	
31	1,23	
32	2,15	
33	0,08	
34	1,07	
35	1,08	

**Tabla IV.9.** Resultados de la actividad GAA intralinfocitaria de los pacientes con DBS de valores alterados. Las actividades enzimáticas están expresadas en nmol/min/mg proteína. Se muestran en rojo los valores fuera de los límites de la normalidad.

Los estadísticos descriptivos de los valores que resultaron patológicos, y que tienen una significación diagnóstica real, se muestran en la Tabla IV.10.

	MEDIA	D.S.	P5	P95	MIN	MAX
Actividad GAA intralinfocitaria	0,033	0,029	0,003	0,082	0,001	0,09

**Tabla IV.10.** Descripción estadística de los resultados obtenidos para la actividad GAA intralinfocitaria. Las actividades enzimáticas están expresadas en nmol/min/mg proteína.

El total de 35 determinaciones no se corresponde exactamente con las 42 muestras DBS de valores fuera de la normalidad, porque en aquellos individuos que presentaban una actividad GAA fuera de rango o surgía algún indicio de duda sobre esta determinación enzimática, se optó por repetir la técnica en DBS con una nueva muestra solicitada al clínico/paciente correspondiente, en lugar de pasar directamente a la determinación intralinfocitaria, y ahí reside la diferencia numérica.

## **4. Determinación de glucosa tetrasacárido como biomarcador diagnóstico de la enfermedad de Pompe**

Ya hemos hablado ampliamente de la importancia de la glucosa tetrasacárido (Glc4) para el diagnóstico y seguimiento de la enfermedad de Pompe. Uno de los objetivos planteados en la tesis consistía en significar de alguna forma la importancia que este parámetro puede representar como biomarcador diagnóstico de la enfermedad.

Llevaremos a cabo este proceso mediante la elaboración de una curva ROC que nos permita: evaluar cuantitativamente la exactitud de esta prueba diagnóstica mediante el cálculo del área bajo la curva ROC y seleccionar los niveles de corte/decisión gracias al estudio de sensibilidad/especificidad implícitos en la construcción de la curva ROC.

### **4.1. Resultados de la cuantificación de la glucosa tetrasacárido en la población estudiada.**

Para el correcto estudio de la Glc4 como biomarcador diagnóstico de EP partimos de dos poblaciones de pacientes: un grupo de pacientes diagnosticados de la enfermedad y un grupo control de individuos sanos.

En las Figuras IV.1 y IV.2 podemos observar ejemplos de los cromatogramas obtenidos, tanto para pacientes enfermos como para controles sanos.

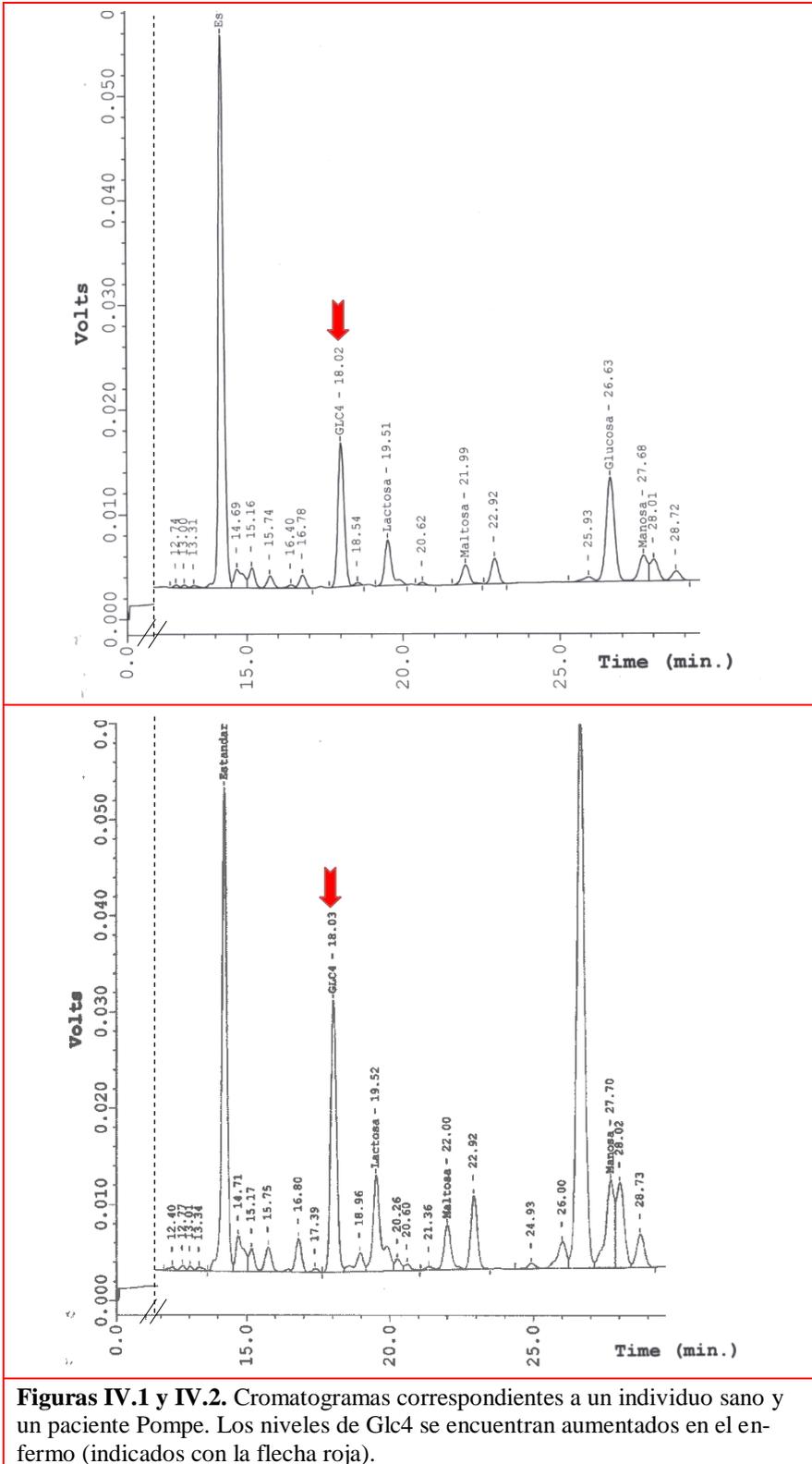
El grupo de enfermos Pompe estuvo formado por 16 pacientes (los 16 pacientes diagnosticados a lo largo del año 2011 en los que participó nuestro laboratorio) de edades comprendidas entre 1 y 56 años. Y el grupo control constaba del mismo número de pacientes (ya que según la experiencia recogida en la bibliografía es preferible tener igual número de individuos en los subgrupos que van a conformar la curva ROC) con edades comprendidas entre 7 y 56 años.

Los resultados obtenidos en la cuantificación de Glc4 y su descripción estadística quedan reflejados en las Tablas IV.11 y IV.12.

GRUPO CONTROL DE PACIENTES SANOS			GRUPO DE PACIENTES CON ENFERMEDAD DE POMPE		
MUESTRA	EDAD	Glc4 mmol/mol creatinina	MUESTRA	EDAD	Glc4 mmol/mol creatinina
I	7	0,951	1	1	65,63
II	9	1,049	2	2	22,91
III	10	0,942	3	15	12,11
IV	12	0,558	4	15	15,21
V	13	0,689	5	17	31,79
VI	15	0,911	6	21	5,41
VII	24	0,307	7	22	46,49
VIII	26	0,718	8	24	1,19
IX	30	0,764	9	24	30,59
X	31	0,758	10	35	2,19
XI	32	1,055	11	45	1,05
XII	39	0,847	12	48	5,82
XIII	42	0,696	13	48	10,23
XIV	50	1,042	14	49	37,14
XV	55	1,007	15	54	1,61
XVI	56	1,084	16	56	7,56

	MEDIA	D.S.	P5	P95	MIN	MAX
<b>GRUPO CONTROL DE PACIENTES SANOS</b>	0,803	0,213	0,495	1,062	0,307	1,084
<b>GRUPO DE PACIENTES CON ENFERMEDAD DE POMPE</b>	9,727	19,443	1,148	52,232	1,05	65,63

Una vez descrita la población procedemos a cuantificar la importancia de este parámetro mediante la elaboración de una curva ROC.



**Figuras IV.1 y IV.2.** Cromatogramas correspondientes a un individuo sano y un paciente Pompe. Los niveles de Glc4 se encuentran aumentados en el enfermo (indicados con la flecha roja).

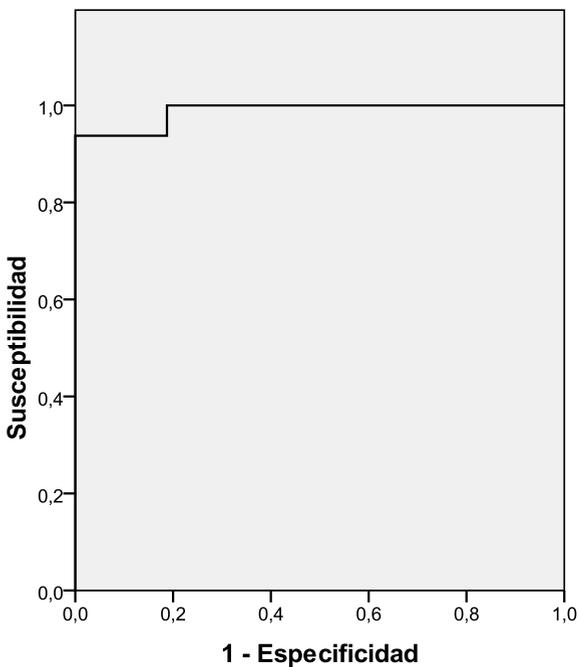
## 4.2. Construcción de una curva ROC para evaluar la importancia de la glucosa tetrasacárido como biomarcador diagnóstico de enfermedad de Pompe

La curva ROC es un gráfico en el que se representan todos los pares sensibilidad/especificidad resultantes de la variación continua de los puntos de corte en todo el rango de resultados observados. En el *eje y* de coordenadas se sitúa la sensibilidad (S) o fracción de verdaderos positivos. En el *eje x* se sitúa la fracción de falsos positivos o 1-especificidad (1-E).

Cada punto de la curva representa un par S/1-E correspondiente a un nivel de decisión determinado. Una prueba con discriminación perfecta, sin solapamiento de resultados en las dos poblaciones, tiene una curva ROC que pasa por la esquina superior izquierda, donde S y E toman valores máximos (S y E = 1). Una prueba sin discriminación, con igual distribución de resultados en los dos subgrupos, da lugar a una línea diagonal de 45°, desde la esquina inferior izquierda hasta la superior derecha. La mayoría de las curvas ROC caen entre estos dos extremos. Cualitativamente, cuanto más próxima es una curva ROC a la esquina superior izquierda, más alta es la exactitud global de la prueba.

Las curvas ROC son índices de la exactitud diagnóstica y proporcionan un criterio unificador en el proceso de evaluación de una prueba<sup>334, 335</sup>, debido a sus diversas aplicaciones.

Nosotros hemos construido una curva ROC a partir de los resultados de Glc4 obtenidos en los dos grupos de pacientes utilizando el software estadístico *IBM SPSS Statistics 17.0*. La curva se representa en la Figura IV.3 y las coordenadas de cada uno de los puntos acompañadas de sus respectivos valores de Sensibilidad/1-Especificidad se representan en la Tabla IV.13.



COORDENADAS DE LA CURVA		
Positivo si mayor o igual que <sup>a</sup>	S	1-E
-,4420	1,000	1,000
0,6235	1,000	0,938
0,6925	1,000	0,875
0,7300	1,000	0,813
0,7755	1,000	0,750
0,8170	1,000	0,688
0,8790	1,000	0,625
0,9265	1,000	0,563
0,9465	1,000	0,500
0,9575	1,000	0,438
0,9855	1,000	0,375
1,0245	1,000	0,313
1,0455	1,000	0,250
1,0495	1,000	0,188
1,0525	0,938	0,188
1,0630	0,938	0,125
1,0775	0,938	0,063
1,1370	0,938	0,000
1,4000	0,875	0,000
1,9000	0,813	0,000
3,8000	0,750	0,000
5,6150	0,688	0,000
6,6900	0,625	0,000
8,8950	0,563	0,000
11,1700	0,500	0,000
13,6600	0,438	0,000
19,0600	0,375	0,000
26,7500	0,313	0,000
31,1900	0,250	0,000
34,4650	0,188	0,000
41,8150	0,125	0,000
56,0600	0,063	0,000
66,6300	0,000	0,000

a. El menor valor de corte es el mínimo valor de contraste observado menos 1, mientras que el mayor valor de corte es el máximo valor de contraste observado más 1. Todos los demás valores de corte son la media de dos valores de contraste observados ordenados y consecutivos.

La evaluación cuantitativa de la exactitud se obtiene específicamente mediante el cálculo del área bajo la curva ROC (Tabla IV.14).

ÁREA BAJO LA CURVA				
Area	Error típico	Significación <sup>a</sup>	Intervalo de confianza al 95%	
			Límite inferior	Límite superior
0.988	0.014	0,000	0,000	1,000

**Tabla IV.14.**

a. Hipótesis nula: área verdadera=0,5

El área bajo la curva nos permite cuantificar cuán buena es la capacidad de discriminación de un biomarcador entre individuos sanos/enfermos. Nuestro valor, superior a 0,9 indica que la Glc4 es un biomarcador muy apto para clasificar a un individuo como sano/enfermo según sus niveles.

Las coordenadas de cada uno de los puntos que componen la curva y sus correspondientes valores de Sensibilidad/1-Especificidad, nos permiten establecer el nivel de decisión o punto de corte más apropiado para la clasificación de los enfermos.

En nuestro caso, el valor de Glc4 de 1,0495 mmol/mol creatinina con una Sensibilidad del 100% y una Especificidad del 81,2% nos parece el más apropiado como punto de corte para discriminar entre individuos; considerándose sanos aquellos con niveles de Glc4 inferiores a este valor y enfermos a aquellos con niveles superiores.

## 5. Contribución del estudio molecular al diagnóstico definitivo de la enfermedad de Pompe

El empleo de técnicas de biología molecular para el estudio de mutaciones puntuales permite realizar una detección precoz, segura y rápida de estas alteraciones. Para poder evaluar de forma ideal la efectividad de nuestra técnica de detección por PCR a tiempo real, debemos tener en cuenta tres grupos de pacientes: controles sanos, pacientes heterocigotos para IVS1-13T>G y pacientes homocigotos para la mutación. Sin embargo, es necesario tener en cuenta que esta es una enfermedad poco frecuente y, dentro del grupo de pacientes, la homocigosis de la mutación IVS1-13T>G es extremadamente rara.

Para el desarrollo de ésta técnica, la población de partida consistió en los pacientes estudiados por nuestro laboratorio de los que recibimos posterior confirmación diagnóstica a través de los clínicos que siguen a dichos pacientes. El diagnóstico molecular que describe las mutaciones que padecen, se realizó por secuenciación en distintos centros de referencia y dicha información nos fue remitida por los clínicos correspondientes.

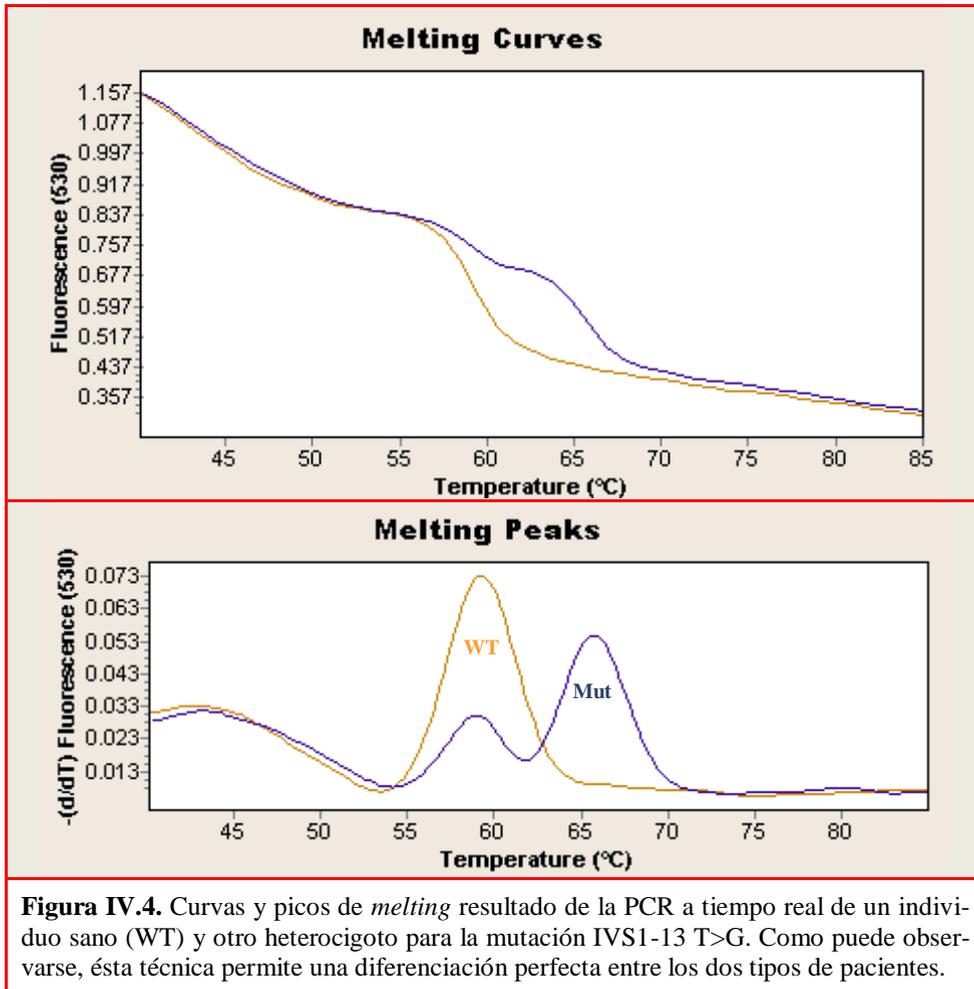
Así, contamos para nuestro estudio con 3 pacientes heterocigotos para la mutación IVS1-13T>G (posteriormente recibimos nuevos pacientes en los que se identificó ésta mutación por nuestro propio método, apartado 7. *Población de pacientes diagnosticados de enfermedad de Pompe según nuestro protocolo diagnóstico*) y 3 controles sanos, no teniendo a nuestra disposición ningún paciente con la mutación IVS1-13T>G en homocigosis. De forma que, para nuestro estudio, únicamente contaremos con un grupo control y otro de pacientes heterocigotos. Ésta deficiencia no es sustancial, pues la técnica de PCR a tiempo real mantiene la capacidad de detección de la mutación presente de forma inherente en los individuos heterocigotos.

Por otra parte, realizamos una comparación de los resultados obtenidos con dos sondas SimpleProbe correspondientes a las formas silvestre y mutante del gen (T y G respectivamente). Tras las experiencias realizadas, se concluyó que la sonda silvestre-T no era informativa mientras que la sonda mutante-G tipifica correctamente a los genotipos tanto silvestre como mutante y, en consecuencia, la sonda SimpleProbe-G fue la elegida para formar parte de la técnica definitiva.

El resultado final de las PCR's a tiempo real, fueron dos curvas de *melting* diferentes para los dos tipos de pacientes: sanos (WT) y heterocigotos para IVS1-13T>G (Mut). El análisis de las curvas reveló una temperatura de *melting* media de 59,2°C para los controles sanos, mientras que los controles heterocigotos mostraron además una segunda curva de *melting* a una temperatura de 66,4°C (Figura IV.4).

Estos resultados concuerdan con las bases genéticas, ya que los controles sanos presentan en la posición -13 del intrón 1 un par de nucleótidos T=A y su temperatura de *melting* es inferior a la de los pacientes heterocigotos que presentan en la misma posición un par G=C.

Por lo tanto las dos poblaciones pueden quedar bien definidas por este método, de forma que mediante esta técnica queda perfectamente identificada la mutación IVS1-13T>G.



Estos resultados favorables son aplicables tanto para sangre total como para las muestras DBS, requiriendo éstas últimas un proceso de elución previo y un mayor número de ciclos de amplificación, pero aportando un alto valor clínico al ser muestras mucho más cómodas de manejar tanto para los pacientes como para el laboratorio.

## 6. Estudio coste/efectividad

El último objetivo que planteado en esta Tesis consistía en: *Proposición de un algoritmo diagnóstico de la enfermedad de Pompe para el Laboratorio Clínico*. Para poder alcanzarlo nos parece imprescindible, además de establecer un organigrama de pruebas que responda a un plan de actuación lógico para el laboratorio, realizar un pequeño estudio coste/efectividad que nos permita construir dicho algoritmo diagnóstico con bases más sólidas y completas.

En función de lo dicho, procederemos a indicar el cálculo del coste que suponen cada una de las determinaciones que componen la batería de pruebas disponibles por nuestro laboratorio y que participan, con la información que aportan, en la consecución del diagnóstico de la enfermedad.

Teniendo en cuenta que para los Laboratorios Clínicos la *Unidad Relativa de Valor* (URV) se define en función de la *Determinación de Glucosa en Suero/Plasma* (Determinación de Glucosa = 1 URV), se expresan en las Tablas IV.15 los costes de todas las técnicas realizadas durante el desarrollo de ésta Tesis para llegar al diagnóstico de la enfermedad de Pompe.

Teniendo en cuenta que la URV hace referencia, no sólo al coste económico de una determinación bioquímica, sino también a la complejidad que comporta dicho análisis, se ha optado por expresar en la Tabla VI.15 las URV's de cada técnica, comparativamente, con los valores de URV's que suponen técnicas equivalentes en metodología y complejidad, de forma que pueda evaluarse de forma más cómoda y objetiva el verdadero valor que estas unidades de costo expresan para cada determinación.

Podría resultar revelador un estudio comparativo, más o menos detallado, entre el coste que supone el desarrollo de éstas técnicas por nuestro laboratorio en contraposición a lo requerido por otros centros de referencia.

Sin embargo, preferimos simplemente mostrar que el diagnóstico de esta enfermedad por el Laboratorio Clínico no tiene por qué suponer un alto gasto económico, y que, la elección de la metodología empleada a lo largo de este estudio, también presenta la ventaja de resultar asequible.

VALOR RELATIVO DE LAS DETERMINACIONES PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD DE POMPE		
Técnica analítica	URV	URV de técnica equivalente*
Determinación de $\alpha$ -glucosidasa ácida en sangre seca recogida sobre papel (DBS)	9,20 URV	⇔ 10,30 URV <sup>I</sup>
Determinación de $\alpha$ -glucosidasa ácida intralinfocitaria	180,75 URV	⇔ 277,80 URV <sup>II</sup>
Cuantificación de los niveles de glucosa tetrasacárido en orina de 24 horas	24,80 URV	⇔ 27,77 <sup>III</sup>
Identificación molecular de la mutación IVS1-13T>G	69,45 URV	⇔ 277,77 URV <sup>IV</sup>

**Tabla VI.15.** El resultado en URV es una estimación aproximada. Estas pruebas no se encuentran en cartera de servicios y por tanto no poseen URV's asignadas de forma oficial.

\* Se han establecido equivalencias entre las URV's de las técnicas estudiadas y otras técnicas de las mismas características para poder disponer de una valoración relativa que permita evaluar de forma más objetiva la diferencia económica existente:

<sup>I</sup> Screening de Tirotropina en DBS

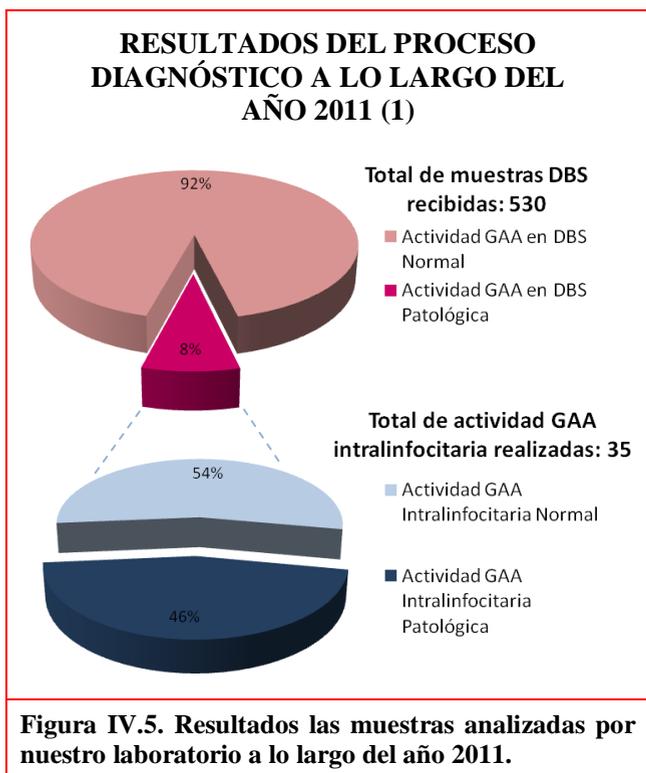
<sup>II</sup> Estudio de la función linfocitaria in vitro

<sup>III</sup> Cuantificación de catecolaminas en orina de 24 hrs

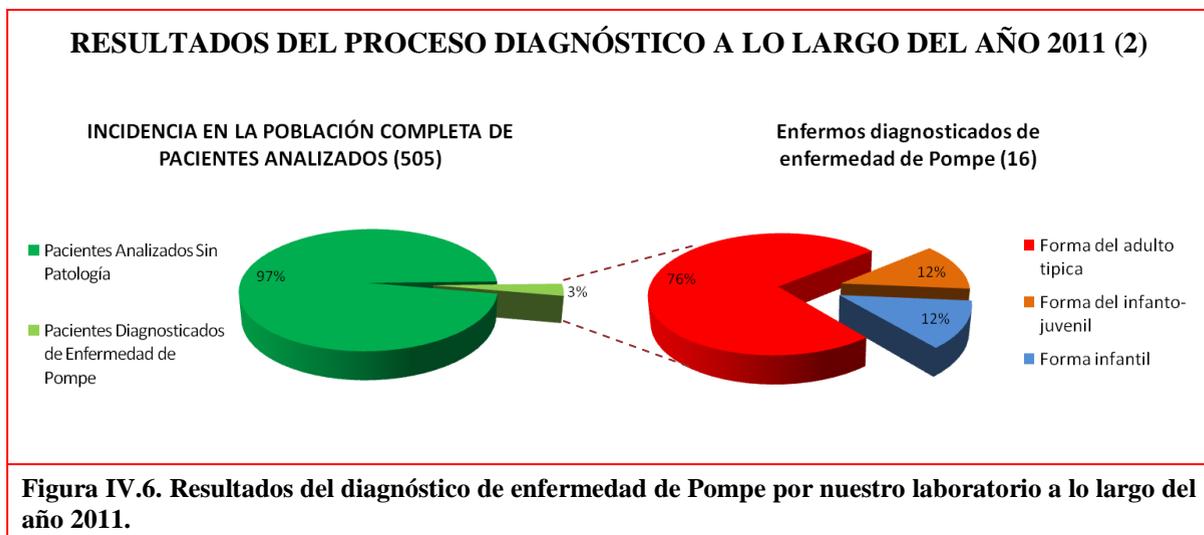
<sup>IV</sup> Identificación genética de una mutación conocida

## 7. Población de pacientes diagnosticados de enfermedad de Pompe según nuestro protocolo diagnóstico

Gracias a los experimentos realizados durante el desarrollo de esta Tesis, pudimos diagnosticar a un total de 16 pacientes con enfermedad de Pompe de los 505 individuos recibidos por nuestro laboratorio para estudio de esta patología.



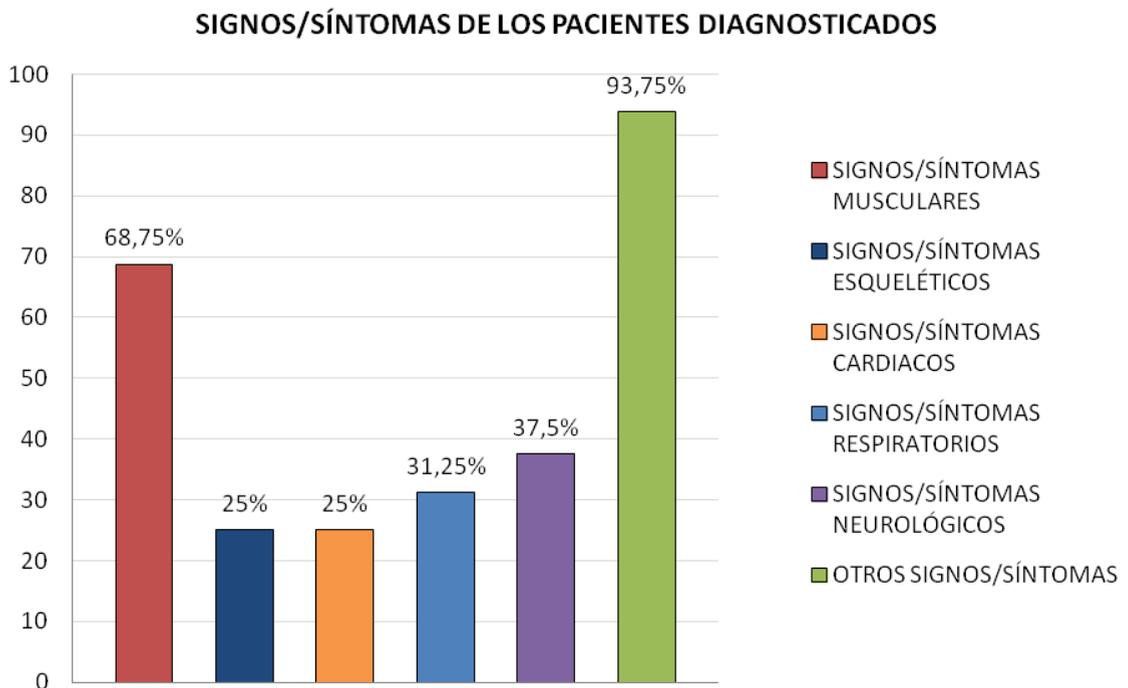
Estos 505 pacientes aportaron un total de 530 muestras de DBS, entre las cuales 42 mostraron valores de actividad GAA alterados en alguna de sus formas. A partir de éstos resultados, se realizaron 35 determinaciones de actividad GAA intralinfocitaria, de las cuales 16 mostraron resultados de actividad enzimática reducida, correspondientes a los 16 pacientes posteriormente diagnosticados de enfermedad de Pompe (Figura IV.5).



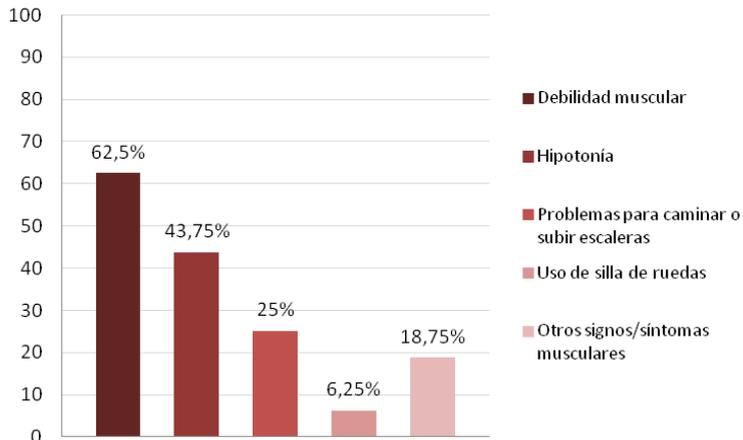
Así, la incidencia de la enfermedad en la población de pacientes con clínica compatible, remitidos a nuestro laboratorio, es aproximadamente del 3% (Figura IV.6). Y en lo referente a las formas de la enfermedad, de estos 16 pacientes, 2 presentaban la forma infantil y 14 la forma del adulto, encontrándose entre éstos 2 pacientes con la variante infanto-juvenil.

Además, se ha realizado una recopilación de los principales signos y síntomas clínicos que presentaban estos 16 pacientes a través de una encuesta enviada a los clínicos responsables del diagnóstico/seguimiento/tratamiento de cada uno de ellos (encuesta en ANEXO III).

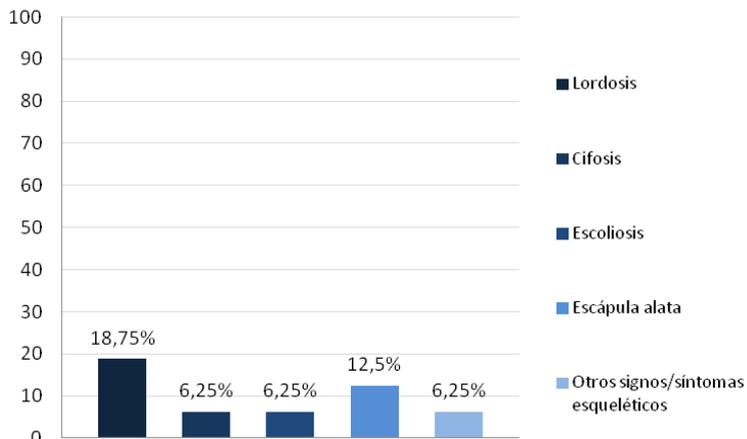
Los resultados obtenidos de esta recopilación de datos se muestran en las Figuras IV.7-11.



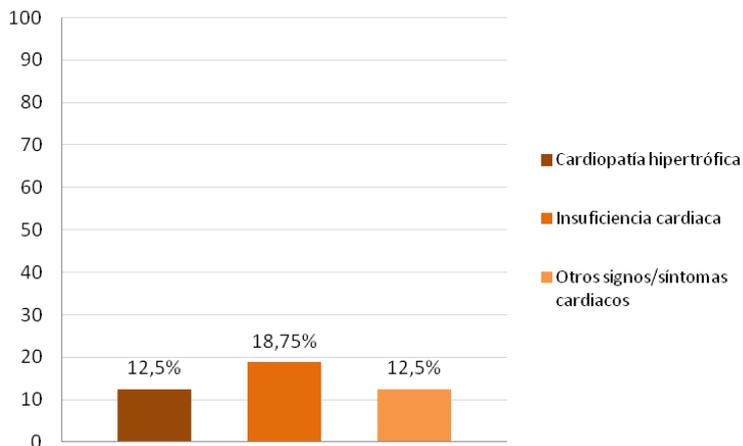
**SIGNOS/SÍNTOMAS MUSCULARES**



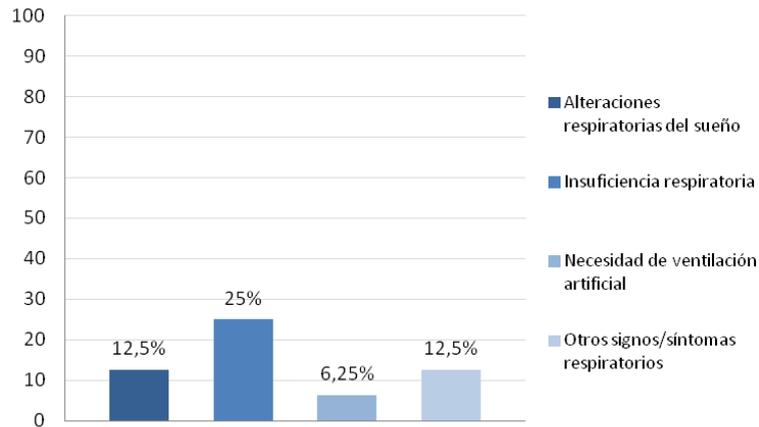
**SIGNOS/SÍNTOMAS ESQUELÉTICOS**



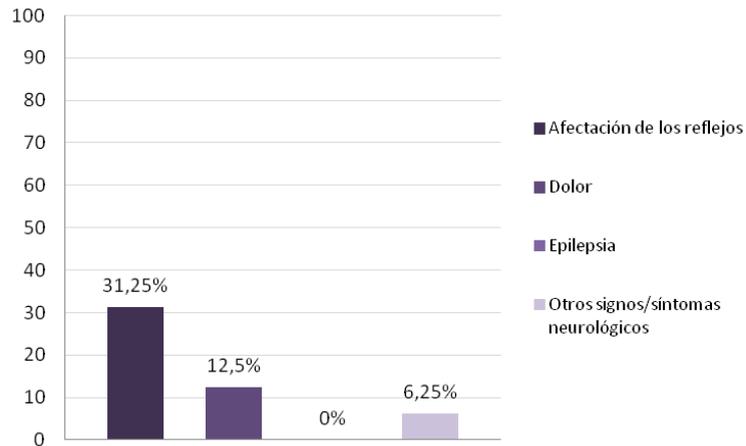
**SIGNOS/SÍNTOMAS CARDIACOS**



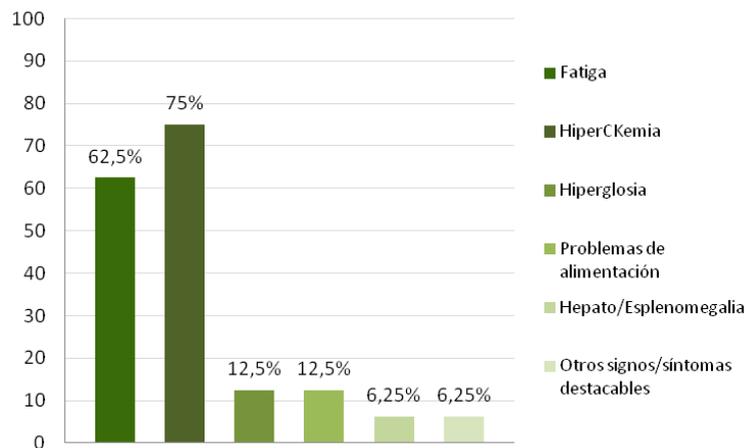
**SIGNOS/SÍNTOMAS RESPIRATORIOS**



**SÍNTOMAS/SIGNOS NEUROLÓGICOS**



**OTROS SIGNOS/SÍNTOMAS**

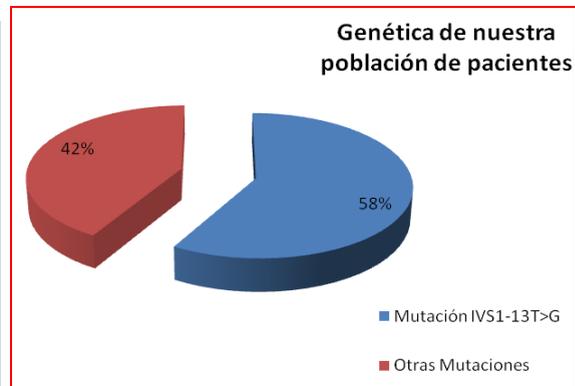


Puede resultar de interés para posteriores trabajos y para futuras recopilaciones de datos, informar de la edad al diagnóstico de todos estos pacientes, datos que quedan reflejados en la Tabla IV.16.

<b>DIAGNÓSTICO DE LOS PACIENTES CON ENFERMEDAD DE POMPE</b>		
<b>PACIENTE</b>	<b>FORMA DE PRESENTACIÓN DE LA ENFERMEDAD</b>	<b>EDAD AL DIAGNÓSTICO</b>
1	Infantil	2 meses
2	Infantil	3 meses
3	Variedad infanto-juvenil	8 meses
4	Variedad infanto-juvenil	1,5 años
5	Adulto	21 años
6	Adulto	24 años
7	Adulto	25 años
8	Adulto	33 años
9	Adulto	35 años
10	Adulto	40 años
11	Adulto	44 años
12	Adulto	44 años
13	Adulto	46 años
14	Adulto	49 años
15	Adulto	54 años
16	Adulto	56 años

Asimismo, es importante hacer hincapié en los hallazgos genéticos obtenidos, quedando estos datos expuestos en la Tabla IV.17 y la Figura IV.12.

ESTUDIO MOLECULAR DE LOS PACIENTES CON ENFERMEDAD DE POMPE			
PACIENTE	MUTACIÓN PRESENTE		
5	<b>-32-13T&gt;G [IVS 1-13] (error splicing)</b>	//	1755-1G>A (stop)
6	?	//	?
7	1655T>C (Leu552Pro)	//	1204T>C (Trp402Arg)
8	923A>T (His308Leu)	//	2014C>T (Arg672Trp)
9	<b>-32-13T&gt;G [IVS 1-13] (error splicing)</b>	//	?
10	<b>-32-13T&gt;G [IVS 1-13] (error splicing)</b>	//	1432G>A (Gly478Arg)
11	<b>-32-13T&gt;G [IVS 1-13] (error splicing)</b>	//	?
12	1645G>C (Gly549Arg)	//	692+1G>C (stop)
13	<b>-32-13T&gt;G [IVS 1-13] (error splicing)</b>	//	2639C>A (Ala880Asp)
14	?	//	?
15	<b>-32-13T&gt;G [IVS 1-13] (error splicing)</b>	//	1447G>T (Gly483Arg)
16	<b>-32-13T&gt;G [IVS 1-13] (error splicing)</b>	//	2338A>G (Ile780Val)



Sólo se expresan las mutaciones de la forma del adulto, para las que está disponible la identificación de IVS1-13T>G.

El estudio molecular referente a aquellos pacientes descritos sin IVS1-13T>G ha sido realizada por otros laboratorios.

(?) No todas las mutaciones han podido describirse aún. Algunas continúan a la espera de ser identificadas.

Quedan así completamente diagnosticados y descritos todos los pacientes que padecían la enfermedad de Pompe, partiendo de la población de individuos con distintos signos compatibles con la afección, que fueron sometidos a nuestro estudio.



# **DISCUSIÓN**



## V. DISCUSIÓN

La enfermedad de Pompe es una enfermedad autosómica recesiva del metabolismo del glucógeno causada por una deficiencia de la enzima lisosomal  $\alpha$ -glucosidasa ácida. Existen distintas formas de la enfermedad con tasas variables de evolución que van desde un curso rápidamente progresivo, a menudo mortal durante el primer año de vida (forma infantil), a una más lenta, pero inexorablemente progresiva, causante de una importante morbi-mortalidad más o menos prematura (forma del adulto). En todos los casos, el inicio temprano de la terapia de sustitución enzimática (TES) es necesaria para obtener el máximo beneficio terapéutico, lo que subraya la necesidad de un diagnóstico precoz.

Antes del año 2006, el tratamiento de los pacientes con enfermedad de Pompe se basaba principalmente en una terapia paliativa. El desarrollo de la TES, representa el primer tratamiento específico y efectivo para los pacientes con esta patología.

En los lactantes, resulta imprescindible comenzar la terapia de reemplazo enzimático lo antes posible para obtener el máximo beneficio terapéutico, lo que denota, una vez más, la necesidad ineludible de un diagnóstico temprano. Para los adultos, al ser una enfermedad de acumulo, y por lo tanto en la que el daño fisiopatológico es progresivo, un retraso en el diagnóstico supone un aumento del deterioro orgánico que puede llegar a ser importante e incluso irreversible. Por ello, también para esta forma de la enfermedad es de vital trascendencia establecer un diagnóstico correcto en el menor tiempo posible e iniciar el tratamiento inmediatamente. Desgraciadamente la realidad es muy distinta, ya que se ha demostrado que, para la forma infantil, la edad promedio al momento del diagnóstico ronda los 4,5-5,3 meses, mientras que los síntomas aparecen por primera vez a la edad de 2 meses<sup>159</sup>; y los adultos por su parte, hasta el 20% de ellos sufren un retraso diagnóstico de entre 1 y 5 años<sup>191, 192</sup>.

El diagnóstico precoz requiere, por tanto, de una mayor concienciación entre los médicos respecto a las características clínicas de la enfermedad y de técnicas diagnósticas rápidas y fiables que confirmen la deficiencia de GAA. Se han propuesto varios algoritmos clínicos para diagnosticar la enfermedad de Pompe (Figuras I.19 y I.20), pero no existe un protocolo estandarizado por parte del Laboratorio Clínico.

En los últimos tiempos, se ha desarrollado una batería de nuevos métodos para medir la actividad GAA y otros parámetros que ponen en evidencia la existencia de esta patología. En el desarrollo de esta Tesis hemos tratado de revisar los datos generados por éstas técnicas y establecer un consenso sobre la aplicación de dichos métodos para el diagnóstico de la enfermedad de Pompe por el laboratorio.

Entre los diversos tipos de muestras utilizadas de forma clásica para el diagnóstico de la enfermedad destacan la biopsia muscular y el cultivo de fibroblastos obtenidos mediante biopsia de piel. En las biopsias musculares se puede medir la actividad GAA, pero se prefiere usar este tejido para buscar las vacuolas de acúmulo que ponen de manifiesto la patología. Por otro lado, la actividad GAA en fibroblastos sí se utiliza a menudo para confirmar la deficiencia enzimática y llegar al diagnóstico de pacientes que presentan síntomas compatibles. La medición de la actividad enzimática en leucocitos y/o sangre total también se elige en ocasiones.

Sin embargo, estos tejidos están dejando de ser muestras de elección para los ensayos de laboratorio. La biopsia muscular supone un riesgo importante para el paciente, sobre todo por la necesidad de anestesia, ya que a menudo éstos presentan de base una depresión del sistema respiratorio. Además, pueden existir irregularidades en la distribución histopatológica de la acumulación de glucógeno y no observarse los acúmulos típicos en pacientes que verdaderamente presentan la enfermedad. Asimismo, el cultivo de fibroblastos tarda varias semanas, originando un retraso en el diagnóstico y el inicio del tratamiento. Por su parte, la determinación de la actividad GAA en leucocitos y/o sangre periférica se ve afectada por la presencia de maltasa glucoamilasa (MGA), otra  $\alpha$ -glucosidasa activa a pH ácido que enmascara la auténtica deficiencia de GAA.

Teniendo en cuenta todas estas deficiencias, el conjunto de técnicas analíticas, orientadas a alcanzar el diagnóstico de la EP, desarrolladas a lo largo de esta tesis, está compuesto por:

- Determinación de actividad  $\alpha$ -glucosidasa ácida en sangre seca recogida sobre papel.
- Determinación de actividad  $\alpha$ -glucosidasa ácida intralinfocitaria.
- Determinación de niveles de glucosa tetrasacárido.
- Detección molecular de la mutación IVS1-13T>G.

La determinación de GAA en DBS puede suponer una valiosa herramienta para facilitar el análisis y evitar el retraso diagnóstico. Ésta técnica representa una opción muy satisfactoria ya que, entre otras ventajas, permite trabajar con menores volúmenes de muestra, supone un modo de trabajo de fácil manejo, de envío sencillo y de menor riesgo de infección, así como aporta una mayor estabilidad de la enzima. Estas ventajas repercuten en beneficio de los pacientes: para los niños cuyo volumen de sangre que puede extraerse es limitado y, tanto para adultos como para niños, el punto de extracción no tiene por qué encontrarse próximo al laboratorio donde finalmente se realizará la determinación, evitando desplazamientos al paciente, pues la muestra puede enviarse por correo sin problemas.

La utilización de muestras DBS para determinación de actividades enzimáticas se ha convertido en una técnica común para el diagnóstico de múltiples enfermedades. Sin embargo, en el caso de la enfermedad de Pompe es necesario tener en cuenta alguna peculiaridad.

Una de las principales dificultades a las que nos enfrentamos a la hora de cuantificar la actividad GAA en DBS es la existencia de otras actividades  $\alpha$ -glucosidasas en la muestra, al fin y al cabo se trata realmente de sangre total y, como indicamos anteriormente, la presencia de MGA puede enmascarar los resultados obtenidos. De este modo, una aportación importante ha sido la incorporación de la acarbosa al ensayo para saldar esta complicación. La acarbosa es un potente inhibidor de la actividad  $\alpha$ -glucosidasa, que induce la acumulación de glucógeno lisosomal en los animales cuando se administran a dosis altas. Recientemente se ha descubierto que la acarbosa en concentraciones más bajas es muy selectiva para la MGA sin serlo contra la GAA; de forma que en nuestro trabajo hemos aprovechado esta innovación, incorporando este inhibidor a nuestra técnica, liberando a la determinación en DBS de su principal contratiempo.

Otra dificultad consiste en la existencia de otras isoenzimas,  $\alpha$ -glucosidasas neutras, con un pH óptimo de acción de 7,5 (diferentes a GAA y MGA, ambas con pH óptimo de 5,0-5,5). Por ello, para que la determinación de actividad GAA sea eficiente y muestre resultados inequívocos, es preciso cuantificar las diferentes fracciones de actividad  $\alpha$ -glucosidasa presentes en la muestra de DBS:

- Actividad  $\alpha$ -glucosidasa ácida total ( $A\alpha G$ ), correspondiente a la actividad  $\alpha$ -glucosidasa cuantificada a pH ácido.
- Actividad  $\alpha$ -glucosidasa neutra total ( $N\alpha G$ ), correspondiente a la actividad  $\alpha$ -glucosidasa cuantificada a pH neutro.
- Actividad  $\alpha$ -glucosidasa ácida inhibida ( $A\alpha GIM$ ) ó actividad ácida efectiva, correspondiente a la actividad  $\alpha$ -glucosidasa cuantificada a pH ácido y con acarbosa como inhibidor de la MGA.
- Cocientes  $N\alpha G/A\alpha G$  y  $(A\alpha G - A\alpha GIM)/A\alpha G$  que completan el estudio.

En individuos sanos,  $A\alpha G$  es el componente principal de la  $A\alpha GIM$ , de forma que en pacientes con EP,  $A\alpha GIM$  se reduce significativamente debido a la importante reducción de los niveles de  $A\alpha G$ . El índice de actividad  $N\alpha G/A\alpha GIM$  se puede utilizar para detectar diferencias en la  $A\alpha G$  con mayor sensibilidad, debido al hecho de que las actividades  $N\alpha G$  son similares entre individuos sanos y pacientes enfermos. Se consigue pues una distinción más clara entre los pacientes con EP y los controles sanos gracias a la relación  $N\alpha G/A\alpha GIM$ . Si además realizamos el cociente  $(A\alpha G - A\alpha GIM)/A\alpha GIM$ , la diferenciación entre controles sanos y enfermos mejora aún más.

La identificación de las diferentes fracciones de actividad enzimática no sólo es necesaria, sino que además aporta un importante valor añadido al proceso permitiendo que el estudio quede totalmente completo.

El trabajo realizado en este estudio, con respecto a las muestras en DBS, cuenta con un número de resultados y una experiencia tales, como para considerar que las conclusiones que pueden extraerse de él disponen de evidencia suficiente. Estas conclusiones, en concordancia con publicaciones anteriores, orientan hacia la utilización de las muestras DBS como determinación de partida para el diagnóstico de la enfermedad de Pompe; de forma que constituye un sistema de cribado eficiente para identificar, de entre la población completa de pacientes estudiados, aquellos que realmente presentan posibilidad de padecer la enfermedad, descartando a todos los individuos no afectados. Así, con los resultados de actividad GAA en DBS “definitivos”, puede darse por finalizado el análisis para los individuos que presenten valores normales y continuar estudiando a aquellos que muestren resultados alterados.

Es importante considerar que las pruebas positivas obtenidas por esta técnica no deben interpretarse, en general, como diagnósticas, sino que se requieren otros procedimientos analíticos posteriores. Sin embargo, éstos resultados ya constituyen una orientación de importante relevancia hacia el diagnóstico de la enfermedad de Pompe.

Una segunda parte que consideramos necesaria para apoyar el diagnóstico de la EP utilizando las muestras DBS, consistía en la evaluación de nuestra participación en un programa de garantía externa de calidad (*Programa piloto de evaluación externa de la calidad para enfermedades lisosomales del CDC de Atlanta*). Los resultados de los estudios de veracidad obtenidos de este modo nos permiten validar la exactitud de los procedimientos de medida empleados y nos aseguran la ausencia de errores relevantes.

Los resultados obtenidos de esta evaluación fueron realmente satisfactorios y corroboran la buena praxis en la metodología seguida.

Por una parte, siendo la Desviación estándar y el Coeficiente de variación indicadores de la representatividad de la media y de la dispersión de los datos (Si  $D.S. < 1$  y  $CV < 0,25$  - media muy representativa y poca dispersión), nuestra Desviación estándar ( $D.S. < 1$ , Tabla IV.7) y nuestros Coeficientes de variación (intra e interensayos -  $CV_1$  y  $CV_2$  ambos  $< 0,25$ , Tabla IV.7), demuestran que la media es muy representativa, que existe muy poca dispersión y que la técnica presenta una muy buena repetitividad de resultados.

Por otro lado, el cálculo de los errores, es quien realmente evalúa la veracidad de nuestros resultados. Todos nuestros valores presentan un error relativo, respecto del valor

convencionalmente verdadero aportado por el programa de calidad, inferior al error máximo permitido por dicho programa.

Así, tanto el cálculo de los errores como la Desviación estándar y Coeficientes de variación de nuestra técnica, ponen de manifiesto que nuestros resultados presentan una veracidad objetivamente demostrada.

Queda así demostrado, no sólo que la determinación de actividad GAA en DBS es un método útil para el diagnóstico de la enfermedad de Pompe, sino también que los resultados aportados por nuestra metodología son veraces, que los valores obtenidos por nuestra técnica son plenamente fiables y que esta calidad en las determinaciones se mantiene a lo largo del año pues todos los envíos realizados reportan resultados favorables.

Por su parte, la determinación de actividad intralinfocitaria supone siempre la confirmación ante unos valores DBS patológicos, certificando el diagnóstico de enfermedad de Pompe.

Los leucocitos totales se utilizan ampliamente para el diagnóstico de numerosas enfermedades lisosomales debido a que la sangre es fácil de obtener y el método de aislamiento es rápido y técnicamente poco exigente. Sin embargo, una vez más, la EP presenta particularidades puesto que se corre el riesgo de proporcionar resultados falsamente negativos debido a la presencia de la ya mencionada MGA, presente en los neutrófilos. Por ello, los linfocitos, que no expresan MGA, suponen la mejor elección para el diagnóstico de EP ya que permiten la determinación de la actividad GAA sin interferencias.

Los principales inconvenientes de la determinación intralinfocitaria son que se requiere una mayor cantidad de sangre (5-8 ml) y que el envío de las muestras no es tan sencillo como en el caso de muestras DBS, siendo necesario, o el envío urgente de la sangre total en las condiciones adecuadas, o bien que el paciente se desplace hasta el centro donde tendrá lugar el aislamiento de linfocitos y realizar allí la extracción.

En nuestro estudio únicamente recurrimos a la determinación intralinfocitaria cuando los resultados de la actividad enzimática en DBS resultaron patológicos en alguna de sus fracciones; entonces se solicitaba una segunda muestra, ésta de sangre total. Al recibirla, se impregnaba una nueva muestra de DBS y se confirmaban los valores alterados detectados con anterioridad; y si éstos resultados se repetían se procedía a la determinación de actividad GAA en linfocitos.

La experiencia previa en el uso de este tipo de muestra, refiere que la presencia de pequeñas cantidades de otras células blancas puede falsear los resultados. En nuestra

técnica, a pesar de aislar correctamente los linfocitos, continuamos usando acarbosa para asegurarnos la ausencia de interferencias en los ensayos.

También en este sentido, la bibliografía recomienda realizar las pruebas de la actividad GAA a diferentes pH's (ácido y neutro), ya que de esta forma se pueden diferenciar las dos fracciones principales de actividad enzimática diferenciando las muestras contaminadas de los verdaderos negativos. El montaje de la técnica sigue el mismo proceso que el usado para DBS (Figuras III.3 y III.7 son similares). Sin embargo, para la actividad intralinfocitaria únicamente informamos la actividad  $\alpha$ -glucosidasa ácida total, pues aporta suficiente evidencia diagnóstica para considerar que el paciente padece la enfermedad, y el resto de fracciones de actividad intralinfocitaria, aunque son igualmente determinadas, resultan de uso exclusivo por el laboratorio para confirmar que la técnica ha transcurredo con normalidad y las muestras eran de buena calidad.

La determinación de actividad GAA también podría realizarse en biopsia muscular y/o cultivo de fibroblastos; de hecho, la técnica de cuantificación de actividad enzimática sería equivalente a la llevada a cabo para DBS y linfocitos, y muchos laboratorios aún la realizan frecuentemente. Sin embargo, la tendencia actual, reportada por los grupos de expertos de esta enfermedad, recomiendan ir abandonando esta metodología en favor de las técnicas en papel y linfocitos.

Ya hemos hablado anteriormente y de forma extensa, de los inconvenientes que presentan estas muestras de partida, pues el problema reside principalmente en la obtención de las mismas: requieren experiencia para su obtención, son pruebas invasivas, precisan anestesia, su transporte es dificultoso y caro... Además, las técnicas de conservación del tejido muscular y cultivo de fibroblastos son más complejas y requieren un mayor tiempo a la hora de emitir resultados, que en el caso de usar linfocitos.

Todas estas razones, convierten la determinación de actividad GAA intralinfocitaria en la técnica de elección por nuestro laboratorio, estando avalada por los resultados obtenidos y la experiencia acumulada.

En el desarrollo de esta Tesis hemos querido también valorar la importancia de la Glc4 como biomarcador diagnóstico de enfermedad de Pompe.

Los cromatogramas, resultado de la técnica, muestran un recorrido en el que no existen señales interferentes respecto al tiempo de retención de la Glc4, ni en controles sanos ni en los pacientes con patología (Figuras IV.1 y IV.2), de forma que el método diferencia específicamente este oligosacárido del resto, identificándolo y cuantificándolo correctamente.

Más concretamente, la estimación de ésta importancia ha quedado demostrada mediante la construcción de una curva ROC.

Para poder juzgar la calidad de una prueba utilizada para el diagnóstico de una enfermedad es fundamental evaluar su capacidad para distinguir entre estados alternativos de salud/enfermedad. El clínico solicita una prueba para decidir, junto con otros datos disponibles, si el paciente tiene o no una condición clínica. Por lo tanto, para que una prueba se incluya en la práctica médica rutinaria es necesario que sea capaz de reducir la incertidumbre asociada con una determinada situación clínica. La principal cualidad clínica de una prueba diagnóstica es su exactitud, definida como la capacidad para clasificar de manera correcta a los individuos en subgrupos clínicamente relevantes. En su forma más simple es la capacidad para distinguir entre dos estados de salud: “sano y enfermo”.

Siempre que una cuestión clínica y el resultado de la prueba diagnóstica encaminada a resolverla, puedan plantearse en términos de dicotomía (presencia o ausencia de enfermedad; positivo o negativo), la exactitud de la prueba puede definirse en función de su sensibilidad y especificidad diagnósticas. Sin embargo, con mucha frecuencia los resultados de las pruebas están distribuidos en una escala continua, por lo que es necesario seleccionar un punto de corte o valor límite adecuado que permita resumir estos resultados en dos categorías: positivo y negativo.

La curva ROC nos permite seleccionar este punto, entre todos los posibles, eligiendo el que nos proporcione una mayor exactitud (sensibilidad y especificidad) respecto a la diferenciación de los individuos sanos/enfermos.

Además, el área bajo la curva ROC es una medida global de la exactitud de la prueba diagnóstica. Se define como la probabilidad de clasificar correctamente un par de individuos sano/enfermo, seleccionados al azar de la población, mediante los resultados obtenidos al aplicarles la prueba. En nuestro caso esta prueba viene dada por los niveles urinarios de Glc4.

Por convenio, el área bajo la curva ROC es siempre mayor o igual que 0,5. Toma valores más cercanos a 1,0 cuanto más perfecta es la separación que existe entre las dos distribuciones. Según los criterios extraídos de la bibliografía: valores entre 0,5 y 0,7 indican baja exactitud, entre 0,7 y 0,9 pueden ser útiles para algunos propósitos y un valor mayor de 0,9 indica exactitud alta. Como queda reflejado en el apartado de Resultados (4.2. *Construcción de una curva ROC para evaluar la importancia de la glucosa tetrasacárido como biomarcador diagnóstico de enfermedad de Pompe*), el área bajo la curva ROC para nuestra técnica es de 0,988, que indica una muy buena exactitud y el valor de Glc4 de 1,0495 mmol/mol creatinina nos permitirá diferenciar a los individuos sanos/enfermos con una sensibilidad del 100% y una especificidad del 81,2%.

Otro punto de corte posible pudo ser el valor de 1,1370 mmol/mol creatinina, con una sensibilidad del 93,8% y una especificidad del 100%. Aunque ambos puntos son realmente buenos, hemos preferido apostar por una mayor sensibilidad arriesgando un pequeño porcentaje de falsos positivos para asegurar que ningún verdadero positivo se pierda y quede sin diagnosticar.

Así, los resultados obtenidos en nuestro estudio, apoyan los antecedentes que proponen a la Glc4 como un biomarcador de buena utilidad para el diagnóstico de los pacientes Pompe.

Además, ante la posible dificultad que representa la recogida de una muestra de orina durante un periodo de 24 horas, sobre todo en el caso de pacientes en edad pediátrica, pueden desarrollarse técnicas basadas en muestras de orina recogidas sobre papel. Esta metodología puede aportar mayor valor diagnóstico y sobre todo a un envío más fácil de las muestras al laboratorio.

Por último resaltar que, aunque este oligosacárido puede encontrarse elevado en otras enfermedades del almacenamiento de glucógeno, la existencia de un déficit específico de actividad GAA junto a una clínica compatible, no dejan lugar a dudas de que nos encontraríamos ante un caso de paciente Pompe.

La última técnica analítica puesta en marcha durante el desarrollo de ésta Tesis es la identificación molecular de la mutación IVS1-13T>G que, más que una técnica diagnóstica, que también lo es, es una prueba que aporta un importante valor añadido al protocolo diagnóstico por el laboratorio.

Cómo hemos indicado con anterioridad, es la mutación más común en Europa y la más típica en la forma del adulto (71% de los pacientes heterocigotos compuestos la presentan). De hecho, resultó que el 58% de los pacientes diagnosticados de la forma del adulto durante el desarrollo de esta Tesis, presentaban esta mutación.

En consecuencia, nos planteamos que sería de gran interés desarrollar un sistema de análisis molecular para detectar la presencia de la mutación a través de una reacción de PCR a tiempo real que nos permitiera identificar de forma precoz, segura y rápida estas transversión.

El resultado obtenido fue la detección de dos curvas *melting* diferentes para los dos posibles alelos: silvestre y mutante IVS1-13; con dos picos *melting* a distintas temperaturas (Figura IV.4), de forma que la presencia de la mutación queda identificada perfectamente y, según aparezca el pico *melting* correspondiente a la forma mutante acompañado o no por el pico correspondiente a la forma silvestre, puede clasificarse al individuo como homo/heterocigoto para la mutación.

La alternativa disponible hasta ahora para la detección de ésta mutación, consistía en enviar una muestra del paciente a un centro de referencia donde se procedía a la secuenciación completa del gen hasta localizar la mutación correspondiente. Con este método podemos llegar, de forma muy eficiente, hasta al diagnóstico molecular sin necesidad de secuenciar todo el gen.

Es cierto que la técnica está diseñada para la detección exclusiva de la mutación IVS1-13T>G, pero su alta prevalencia hace que resulte rentable, tanto en el plano económico (la secuenciación genética de un alelo resulta considerablemente cara), como en relación al tiempo de respuesta por el laboratorio (el envío de la muestra a un laboratorio externo de referencia y la recepción de los resultados puede suponer varias semanas de retraso en el diagnóstico).

Existe además otro motivo a considerar, quizás aún más importante, por el cual la identificación de esta mutación en concreto resulta ideal; y reside en la genética molecular de la mutación. La transversión IVS1-13T>G origina un splicing alternativo que da lugar tanto a transcritos aberrantes en los que queda suprimido el exón 2, como a una pequeña proporción de transcritos completos ( $\approx 10\%$ ) con la información completa para producir la enzima funcional<sup>83, 84, 85</sup>. De este modo, este mecanismo particular es responsable de la escasa, pero significativa, actividad enzimática residual presente en estos pacientes. Por ello, algunos autores llegan a considerar a esta alteración como una mutación “protectora” ya que, incluso en heterocigosis, asegura una producción constitutiva, más o menos mínima, de actividad enzimática y, por tanto, aunque venga acompañada de una mutación que no produzca enzima madura alguna, el individuo tiene asegurada una función  $\alpha$ -glucosidasa residual que explica la expresión fenotípicamente tardía de la enfermedad en los pacientes que la poseen.

En consecuencia, la identificación de esta mutación en los pacientes Pompe, pondrá de manifiesto, de una forma más o menos aproximada, la evolución que el paciente está destinado a presentar, constituyéndose así como una herramienta de vital trascendencia clínica.

Asimismo se pensó, que desarrollando un sistema de extracción del ADN a partir de las muestras DBS, se contribuiría de forma muy importante a la mejora del diagnóstico, proporcionando un sistema de calidad, y sobre todo, de mayor comodidad para clínicos y pacientes, pues este medio de soporte para las muestras de sangre presenta importantes ventajas: simplicidad a la hora de obtener las muestras, poco volumen requerido, facilidad de transporte, estabilidad, menor riesgo de contaminación, mejor manejo de laboratorio...

Consideramos de una relevancia vital, hacer hincapié en la consecución de éste objetivo, pues es un verdadero avance en el proceso diagnóstico poder determinar la existencia de la mutación más prevalente en la forma del adulto a partir de muestras de sangre seca recogida sobre papel pues realmente aporta, si cabe, una mayor eficiencia al diagnóstico genético.

Resulta por tanto que, disponiendo del diagnóstico molecular del paciente, en el caso de presentar la transversión IVS1-13T>G, se dispone de una rica fuente de información, y puede establecerse un programa concreto de actuación gracias a la correlación genotipo-fenotipo existente para ésta mutación, bien conocida y bien descrita (*1.5.1 Genética de la EP*), típica de la forma del adulto.

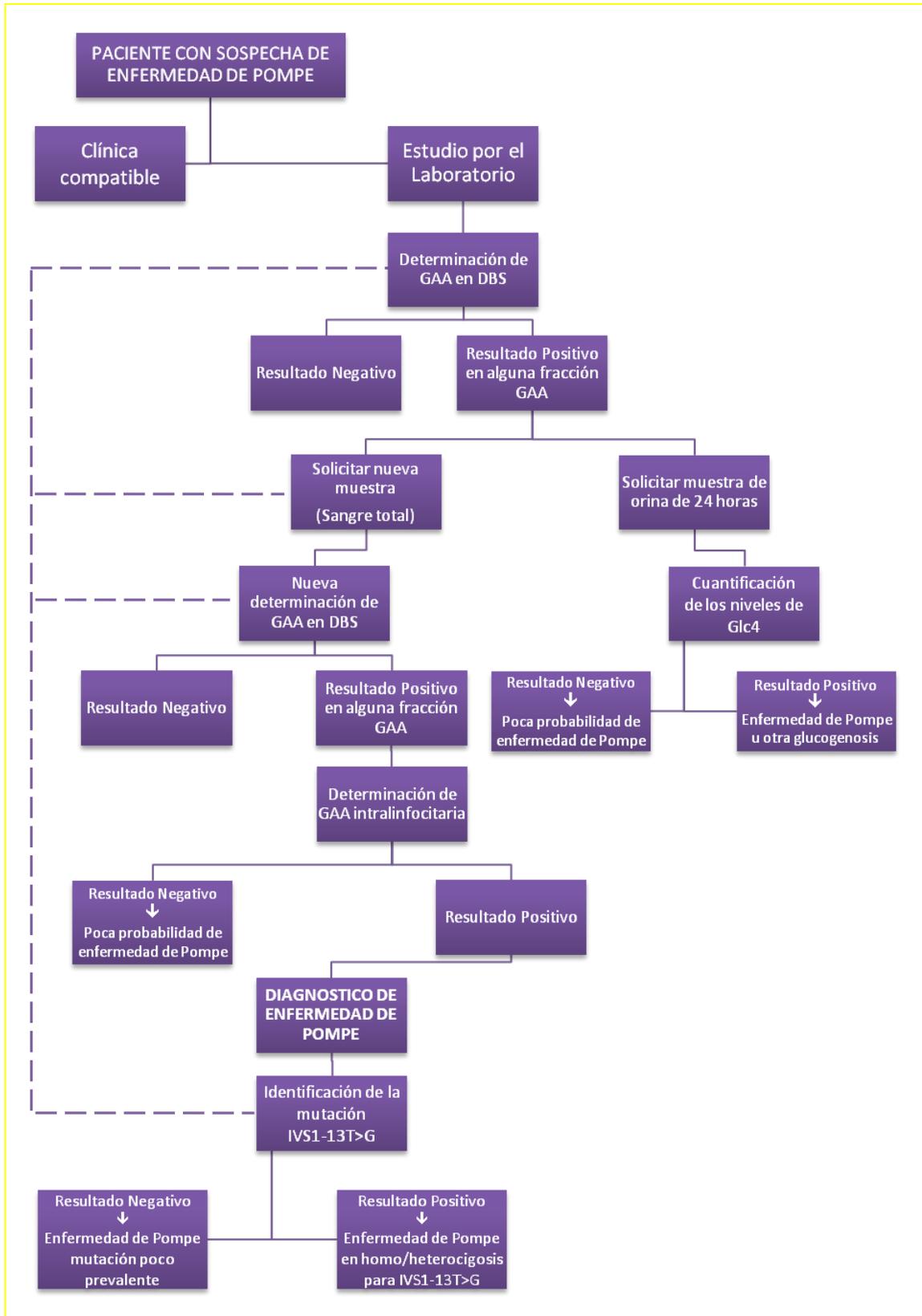
En resumen, gracias al desarrollo de todo este trabajo de investigación, se consiguió llegar al diagnóstico inequívoco de enfermedad de Pompe para un total de 16 pacientes. Sin el proyecto de diagnóstico de enfermedades lisosomales que se está desarrollando en nuestro laboratorio (dentro del cual se encuentra el programa de diagnóstico de enfermedad de Pompe y la presente Tesis), con una alta probabilidad éstos enfermos no habrían sido diagnosticados a lo largo del año 2011, y al menos en el caso de las dos formas infantiles detectadas, las consecuencias habrían resultado fatales.

Además, éste diagnóstico permite a la familia conocer la presencia de alteraciones en el gen *GAA* dentro de su acervo genético y, de esta forma, tomar las decisiones pertinentes en lo respectivo a generaciones futuras.

En relación a los datos que pueden derivarse del diagnóstico de estos enfermos, queda comprobado que tanto en relación a la sintomatología, como a los efectos diagnósticos, las conclusiones que pudieran extraerse están en concordancia con las publicaciones de otras series de pacientes presentes en la bibliografía.

Por último, el objetivo final y compendio del trabajo realizado durante esta Tesis era la “*Proposición de un algoritmo diagnóstico de la enfermedad de Pompe para el Laboratorio Clínico*”. Gracias a los resultados aportados por cada uno de los experimentos realizados, la cohorte de pacientes disponible, las técnicas desarrolladas y puestas a punto, la ratificación de la eficacia de estas técnicas y el pequeño estudio coste/beneficios realizado, nos encontramos en disposición de elaborar un algoritmo diagnóstico orientado al Laboratorio Clínico que responde a las necesidades diagnósticas de los clínicos y que, desde nuestro punto de vista, resulta útil y completo.

Dicho algoritmo diagnóstico, que resume toda la sucesión de técnicas y procedimientos que debe seguir el Laboratorio Clínico, queda reflejado en la Figura V:



Partiendo de un paciente con clínica susceptible de enfermedad de Pompe, se procederá en primer lugar a realizar la punción e impregnación de la cartulina de papel cromatográfico (muestra de sangre seca recogida sobre papel - DBS) y su envío al laboratorio de referencia. Se realiza a continuación, la determinación de las distintas fracciones de actividad GAA en la muestra DBS. En caso de obtener resultados negativos para todas las fracciones de actividad enzimática, se descarta el diagnóstico de enfermedad de Pompe. En el caso de encontrar alteraciones en alguna de las fracciones de GAA debe continuarse con el estudio diagnóstico. Se solicitará entonces una nueva muestra, ésta de sangre total (remitida al laboratorio en las condiciones adecuadas de envío y conservación), acompañadas de otra de orina de 24 horas (también en las condiciones adecuadas).

Por una parte, en la muestra de orina se cuantificará la concentración de Glc4. Si presenta niveles dentro de la normalidad, puede considerarse, con una alta probabilidad, que el paciente no padece de enfermedad de Pompe. Si aparece un aumento de los niveles del tetrasacárido, es muy posible que el paciente sufra algún tipo de glucogenosis. No puede afirmarse que ésta sea efectivamente glucogenosis tipo II, pero las determinaciones en sangre nos permitirán corroborarlo.

Por otra parte, con la muestra de sangre total, impregnamos una nueva tarjeta de papel cromatográfico y realizamos una nueva determinación de actividad enzimática en DBS. De esta forma, revalidamos los resultados obtenidos en el primer análisis. Si los valores obtenidos se encuentran dentro de los límites de la normalidad, reevaluando los resultados anteriores, podrá descartarse la existencia de la patología. Si aparecen alteraciones en alguna de las fracciones de la actividad GAA procederemos a continuar con el estudio.

Se realiza en este momento la determinación de actividad intralinfocitaria, previo aislamiento de los linfocitos de la sangre total remitida. Ésta es la técnica gold standard para el diagnóstico de la enfermedad de Pompe, y por lo tanto, será la que nos proporcione el diagnóstico definitivo. Si este método aporta resultados negativos, puede descartarse, con bastante seguridad, que el paciente se encuentre afectado de la enfermedad. Si los resultados resultan positivos, se ha llegado al diagnóstico de enfermedad de Pompe.

La suma de una clínica compatible y resultados positivos en DBS y linfocitos, acompañados de concentraciones de Glc4 en orina también positivas, conducen al diagnóstico irrefutable de enfermedad de Pompe.

Llegados a este punto, podemos proceder a la determinación molecular de la mutación existente. Se buscará así, por PCR a tiempo real, identificar la presencia de la mutación IVS1-13T>G, tanto a partir de la muestra de sangre líquida remitida en segundo término, como a partir de cualquiera de las muestras en DBS disponibles. Si el individuo

presenta otra mutación, los resultados serán negativos, pero si esta transversión está presente, la técnica la pondrá de manifiesto habiéndose alcanzado el diagnóstico molecular y disponiéndose, en este caso, de la descripción completa de la patología.

Éste, nos parece el mejor esquema a seguir por el Laboratorio Clínico para llegar al diagnóstico definitivo de la enfermedad de Pompe. Por un lado, se incluyen en la parte alta del algoritmo las pruebas de screening (actividad en DBS), que presentan una mayor sensibilidad, pues trata de evitarse la pérdida de ningún paciente; además son más cómodas para pacientes y clínicos, y son las que resultan más económicas (ver Tabla IV.15). A continuación, se procede a realizar las pruebas confirmatorias (actividad intralinfocitaria) con especificidad más alta, evitándose así falsos positivos y aportándonos el diagnóstico de la enfermedad. En paralelo, nuestro algoritmo cuenta con un biomarcador de apoyo al diagnóstico (Glc4 en orina), también de alta sensibilidad y buena especificidad, que respalda los resultados de los demás análisis. En el último escalón, debido a su mayor especificidad y coste más elevado, y una vez alcanzado el diagnóstico, resulta de gran interés llevar a cabo el estudio molecular (identificación de la mutación IVS1-13T>G) ya que aporta información que puede resultar muy útil en cuanto al tratamiento y evolución de los enfermos.

Únicamente resta decir, que con la proposición de éste algoritmo quedan centralizados todos los experimentos realizados, todas las técnicas propuestas y todos los esfuerzos invertidos en el desarrollo de esta Tesis. Concluyendo que, el Laboratorio Clínico, en armonía con la práctica médica de directo contacto con el paciente, posee por sí mismo la capacidad de llegar al diagnóstico definitivo de la enfermedad de Pompe para aquellos pacientes que la sufren, y con el presente trabajo que presentamos, tratamos de poner de manifiesto este papel que desempeña, considerando que debe ser reconocido y valorado.



# CONCLUSIONES



## VI. CONCLUSIONES

Las conclusiones extraídas de la presente Tesis doctoral son las que se exponen a continuación:

- 1º. El diagnóstico de la enfermedad de Pompe plantea, a menudo, una dificultad importante debido a la rareza de la condición y a la naturaleza relativamente poco específica de las características fenotípicas propias de la patología. Por ello se ha realizado en la presente Tesis una extensa búsqueda bibliográfica con objeto de proporcionar a los clínicos una revisión lo más completa posible sobre los conocimientos actuales en la enfermedad de Pompe.
- 2º. El diagnóstico precoz es de vital importancia, principalmente para la forma infantil, y requiere, tanto de una mayor conciencia entre los clínicos respecto a las características de la enfermedad, como de pruebas diagnósticas rápidas y fiables que confirmen la deficiencia enzimática de la  $\alpha$ -glucosidasa ácida.
- 3º. La determinación de actividad  $\alpha$ -glucosidasa ácida en sangre seca recogida sobre papel supone un método de screening eficaz y de alta calidad, que permite un primer acercamiento diagnóstico a la enfermedad.
- 4º. La determinación de actividad  $\alpha$ -glucosidasa ácida intralinfocitaria se reafirma como gold-standard para el diagnóstico de la enfermedad de Pompe, no siendo necesario recurrir al análisis en otros tejidos: tejido muscular, mediante biopsia; y fibroblastos con cultivo celular.
- 5º. La glucosa tetrasacárido en orina ha demostrado ser un biomarcador de alta sensibilidad y buena especificidad diagnósticas, aportando, junto con las pruebas sanguíneas, un apoyo importante para el diagnóstico de la enfermedad.
- 6º. El estudio molecular de la mutación IVS1-13T>G mediante PCR a tiempo real, supone una metodología que nos permite identificar de forma precoz, segura y rápida esta transversión, permitiendo llevar el diagnóstico hasta su último término y proporcionando a los clínicos una información muy útil gracias a la correlación genotipo-fenotipo existente para ésta mutación. Su identificación a partir de muestras de sangre seca recogida sobre papel supone un verdadero avance en el proceso diagnóstico aportando, si cabe, aún mayor eficiencia.

- 7°. Se propone un algoritmo diagnóstico que organiza de forma coherente y consecuente el conjunto de métodos analíticos de laboratorio que permiten llegar hasta el diagnóstico definitivo de la enfermedad de Pompe.
- 8°. El Laboratorio Clínico posee, por sí mismo, la capacidad de llegar al diagnóstico definitivo de la enfermedad de Pompe y se considera que este papel clínico, por él desempeñado, debe ser reconocido y valorado.





**ANEXOS**



**ANEXO I****SECUENCIA COMPLETA DEL GEN GAA.**

1	<b>ACCCGCCTCT</b>	<b>GCGCGCCCC</b>	<b>GGGCACGACC</b>	<b>CCGGAGTCTC</b>	<b>CGCGGGCGGG</b>	<b>CAGGGCGCGC</b>
61	<b>GTGCGCGGAG</b>	GTGAGCCGGG	CCGGGGCTGC	GGGGCTTCCC	TGAGCGCGGG	CCGGGTCGGT
121	GGGGCGGTCC	GCTGCCCGCG	CGGCCTCTCA	GTTGGGAAAAG	CTGAGGTTGT	CGCCGGGGCC
181	GCGGGTGGAG	GTGCGGGATG	AGGCAGCAGG	TAGGACAGTG	ACCTCGGTGA	CGCGAAGGAC
241	CCCGGCCACC	TCTAGGTTCT	CCTCGTCCGC	CCGTTGTTCA	GCGAGGGAGG	CTCTGCGCGT
301	GCCGCAGCTG	ACGGGAAAAC	TGAGGCACGG	AGCGGGTGAG	ACACCTGACG	TCTGCCCCGC
361	GCTGCCGGCG	GTAACATCCC	AGAAGCGGGT	TTGAACGTGC	CTAGCCGTGC	CCCCAGCTC
421	TTCCCTGAG	CGGAGCTTGA	GCCCCAGACC	TCTAGTCCTC	CCGGTCTTTA	TCTGAGTTCA
481	GCTTAGAGAT	GAACGGGGAG	CCGCCCTCCT	GTGCTGGGCT	TGGGGTGGGA	GGGTGCATCT
541	TCCCCTTTCT	AGGGTTTCTT	TTCCCCTTTT	GATCGACGCA	GTGCTCAGTC	CTGGCCGGGA
601	CCCGAGCCAC	CTCTCCTGCT	CCTGCAGGAC	GCACATGGCT	GGGTCTGAAT	CCCTGGGGTG
661	AGGAGCACCG	TGGCTTGAGA	GGGGCCCCCT	GGGCCAGCTC	TGAAATCTGA	ATGTCTCAAT
721	CACAAAGACC	CCCTTAGGCC	AGGCCAGGGG	TGACTGTCTC	TGGTCTTTGT	AGGGATCAGA
781	TGGCACATAG	CACCCGAAAC	CCTTGAAAAC	CGAGTGATGA	GAGAGCCTTT	TGCTCATGAG
841	GTGACTGATG	ACCGGGGACA	CCAGGTGGCT	TCAGGATGGA	AGCAGATGGC	CAGAAAGACC
901	AAGGCCTGAT	GACGGGTTGG	GATGGAAAAG	GGGTGAGGGG	CTGGAGATTG	AGTGAATCAC
961	CAGTGGCTTA	GTCAAACATG	CCTGCAACAAT	GGAAACCCCG	AAGAAAACCAC	AGAGACGCAG
1021	GGGCTTCCCG	CCGGGTTGTG	GAACACACCA	AGGCACTGGA	GGGTGGTGCG	AGCAGAGAGC
1081	ACAGCATCAC	TGCCCCACC	TCACACCAGG	CCCTACGCAT	CTCTTCCATA	CGGCTGTCTG
1141	AGTTTTATCC	TTTGTAATAA	ACCAGCAACT	GTAAGAAAACG	CACCTTCTCTG	AGTTCTGTGA
1201	CCCTGAAGAG	GGAGTCCTGG	GAACCTCTGA	ATTTATAACT	AGTTGATCGA	AAGTACAAGT
1261	GACAACTGG	GATTTGCCAT	TGGCCTCTGA	AGTGAAGGCA	GTGTTGTGGG	ACTGAGCCCT
1321	TAACCTGTGG	AGTCTGTGCT	GACTCCAGGT	AGTGTCAAGA	TTGAATTGAA	TTGTAGGACA
1381	CCCAGCCGTG	TCCAGAAAAGT	TGCAGAATTG	ATGGGTGTGA	GAAAAACCCT	ACACATTTAA
1441	GTTCAGAAGT	GTGGTAACAA	TGTTTACCC	TCCAGCCAG	TCCAGCCAA	TTTACCAGTG
1501	GCCCACGGTG	GAACACCACG	TCCGGCCGGG	GGCAGAGCGT	TCCAGCCAA	GCCTTCTGTA
1561	ACATGACATG	ACAGGTACAGA	CTCCCTCGGG	CCCTGAGTTC	ACTTCTTCT	GGTATGTGAC
1621	CAGTCCCAG	TACCAGAGAA	GGTTGCACAG	TCCTCTGCTC	CAAGGAGCTT	CAGTGGCCAG
1681	GGGCTCCTTT	CTGAAAATCCT	TGCCTGCCTC	TGCTCCAAGG	CCCCTCAAGG	AGAGACGCAG
1741	ACCCCTCTGA	TGGCTGACTT	TGGTTTGAGG	ACCTCTCTGC	ATCCCTCCCC	CATGGCCTTG
1801	CTCCTAGGAC	ACCTTCTTCC	TCCTTCCCT	GGGGTCAGAC	TTGCCTAGGT	GCGGTGGCTC
1861	TCCCAGCCTT	CCCCACGCC	TCCCCATGGT	GTATTACACA	CACCAAAGGG	ACTCCCCTAT
1921	TGAAATCCAT	GCATATTGAA	TCGCATGTGG	TTCCTGGCTG	CTCCTGGGAG	GAGCCAGGCT
1981	AATAGAATGT	TTGCCATAAA	ATATTAATGT	ACAGAGAAGC	GAAACAAAGG	TCGTTGGTAC
2041	TTGTTAACCT	TACCAGCAGA	ATAATGAAAG	CGAACCCCA	TATCTCATCT	GCACGCGACA
2101	TCCTTGTTGT	GTCTGTACCC	GAGGCTCCAG	GTGCAGCCAC	TGTTACAGAG	ACTGTGTTTC
2161	TFCCCATGAT	ACCTCGGGGG	CCGGGAGGGG	TTCTGATCTG	CAAAGTCGCC	AGAGGTTAAG
2221	TCCTTCTCT	CTTGTGGCTT	TGCCACCCCT	GGAGTGTAC	CCTCAGCTGC	GGTGCCAGG
2281	ATTCCCCACT	GTGGTATGTC	CGTGCACCAG	TCAATAGGAA	AGGGAGCAAG	GAAAGTACT
2341	GGGTCCCCCT	AAGGACATAC	GAGTTGCCAG	AATCACTTCC	GCTGACACCC	AGTGACCAA
2401	GCCGCACTT	TATGCAGAAG	TGGGCTGCC	AGCCAGGCGT	GGTCACTCCT	GAAATCCCAG
2461	CACCTCGGAA	GGCCAAGGGG	GGTGGATCAC	TTGAGCTCAG	GAGTTCGAGA	CCAGCCTGGG
2521	TAACATGGCA	AAATCCCGTC	TCTACAAAAA	TACAGAAAAT	TAGCTGGGTG	CGGTGGTGTG
2581	TGCCTACAGT	CCCAGCTACT	CAGGAGGGCTG	AAGTGGGAGG	ATTGCTTGAG	TCTGGGAGGT
2641	GGAGTTGCA	GTGAGCCAGG	ATCTCACACC	AGCACTCTGG	CCCAGGCGAC	AGCTGTTTGG
2701	CCTGTTTCAA	GTGTCTACCT	GCTTGTCTGG	TCTTCTGGG	GCAATTCTAA	GCGTGTTTGA
2761	TTTGTAACAT	TTTAGCAGAC	TGTGCAAGTG	CTCTGCACTC	CCCTGCTGGA	GC'TTTTCTCG
2821	CCCTTCTTTC	TGGCCCTTCT	CCCAGTCTAG	ACAGCAGGGC	AACACCCACC	CTGGCCACCT
2881	TACCCACCT	GCCTGGGTGC	TGCAGTGCCA	GCCGCGGTTG	ATGTCTCAGA	GCTGT'TTGA
2941	GAGCCCGTG	AGTGCCGCC	CTCCGCTC	CCTGCTGAGC	CCGCTTCTT	CTCCCGCAGG
3001	<b>CCTGTAGGAG</b>	<b>CTGTCCAGGC</b>	<b>CATCTCCAAC</b>	<b>CATGGGAGTG</b>	<b>AGGCACCCGC</b>	<b>CCTGCTCCCA</b>
3061	<b>CCGGTCTCTG</b>	<b>GCCGTCTGCG</b>	<b>CCCTCGTGTG</b>	<b>CTTGCCAACC</b>	<b>GCTGCACTCC</b>	<b>TGGGCCACAT</b>
3121	<b>CCTACTCCAT</b>	<b>GATTTCTGCG</b>	<b>TGGTTCCTCCG</b>	<b>AGAGCTGAGT</b>	<b>GGTCTCTCC</b>	<b>CAGTCTGGA</b>
3181	<b>GGAGACTCAC</b>	<b>CAGCTCACCC</b>	<b>AGCAGGGAGC</b>	<b>CAGCAGACCA</b>	<b>GGGCCCCGGG</b>	<b>ATGCCACGGC</b>
3241	<b>ACACCCCGGC</b>	<b>CGTCCCAGAG</b>	<b>CAGTGCCAC</b>	<b>ACAGTGCAGC</b>	<b>GTCCCCCCA</b>	<b>ACAGCCGCTT</b>
3301	<b>CGATTGCGCC</b>	<b>CCTGACAAGG</b>	<b>CCATCACCCA</b>	<b>GGAACAGTGC</b>	<b>GAGGCCCGCG</b>	<b>GCTGTTGCTA</b>

3361	<b>CATCCCTGCA</b>	<b>AAGCAGGGGC</b>	<b>TGCAGGGAGC</b>	<b>CCAGATGGGG</b>	<b>CAGCCCTGGT</b>	<b>GCTTCTTCCC</b>
3421	<b>ACCCAGTAC</b>	<b>CCCAGCTACA</b>	<b>AGCTGGAGAA</b>	<b>CCTGAGCTCC</b>	<b>TCTGAAATGG</b>	<b>GCTACACGGC</b>
3481	<b>CACCTGACC</b>	<b>CGTACCACCC</b>	<b>CCACTTCTT</b>	<b>CCCCAAGGAC</b>	<b>ATCCTGACCC</b>	<b>TGTCCAGTGA</b>
3541	<b>CGTGATGATG</b>	<b>GAGACTGAGA</b>	<b>ACCGCCTCCA</b>	<b>CTTACCGGTG</b>	<b>GGCAGGGCAG</b>	<b>GGGCGGGGGC</b>
3601	<b>GGCGGCCAGG</b>	<b>GCAGAGGGTG</b>	CGCGTGGACA	TCGACACCCA	CGCACCTCAC	AAGGGTGGGG
3661	TGCATGTTGC	ACCCTGTGT	GCTGGGCCCT	TGCTGGGAGC	GGAGGTGTGA	GCAGACAATG
3721	GCAGGCCCC	TCGGGGAGCA	GTGGGGACAC	CACGGTGACA	GGTACTCCAG	AAGGCAGGGC
3781	TCGGGGCTCA	TTCATCTTTA	TGAAAAAGTG	GGTCAGGTAG	AGTAGGGCTG	CCAGAGGTTG
3841	CGAATGAAAA	CAGGATGCC	AGTAAACCCG	AATTGCAGAT	ACCCCAGGCA	TGACTTTGTT
3901	TTTTTGTGTA	AGGATGCAAA	ATTTGGGATG	TATTTATACT	AGAAAAGCTG	CTTGTGTTT
3961	ATCTGAAATT	CAGAGTTATC	AGGTGTTCTG	TATTTACCT	CCATCTGGG	GGAGGCCTCC
4021	TCCTCTGGC	TCTGCAGATG	AGGGAGCCGA	GGCTCAGAGA	GGCTGAAATG	GCTGCCCATG
4081	GTCCACATC	CATGTGTGGC	TGCACCAGGA	CCTGACCTGT	CCTTGGCGTG	CGGGTGTTC
4141	TCTGGAGAGT	AAGGTGGCTG	TGGGGAACAT	CAATAAAACC	CCATCTCTTC	TAGATCAAAG
4201	<b>ATCCAGTAA</b>	<b>CAGCGCTAC</b>	<b>GAGGTGCCCT</b>	<b>TGGAGACCCC</b>	<b>GCATGTCCAC</b>	<b>AGCCGGGCAC</b>
4261	<b>CGTCCCACT</b>	<b>CTACAGCGTG</b>	<b>GAGTCTCCG</b>	<b>AGGAGCCCTT</b>	<b>CGGGGTGATC</b>	<b>GTGCGCCGGC</b>
4321	<b>AGCTGGACGG</b>	<b>CCGCGTGCTG</b>	TGAGTTCCTG	GCTCTGTGCC	AGCATGATGG	GGAGGGCGAC
4381	GCGCATTTCT	CACACGGCAG	GGAGGGCCAC	ACGGTTTTGT	TTCTCACACG	ATGGGCAGGG
4441	CGACACATGT	TTGTTTCTCA	CACGGCGGGG	AGGGCGACGG	GCATTTCTCA	CAGGGCGCTC
4501	CCTGGGTCTT	TTACTCACAT	AGGTCTAAAT	CCCATGTAAA	CACGTGTTC	GGACTCACCA
4561	AGCCCCTGCT	TGTCATTTAA	CTCAGGAAAA	CTCTCAGGAA	CGACAGCACT	TGGATTTGCC
4621	TTAATCTTAA	GAGAAGTTGC	CTTCGGAAAT	GCGTTTTTCT	TTTTTTGCTC	ATTCATTTAC
4681	TCAGTGTCCA	CGCATGACC	CTCCGTGCCG	GGTGGTTTGG	ATCCTGTCTC	CGGGGACAGA
4741	CACACAGTGA	GGGGAAGCCA	TAAGCAAGTC	CATGCAGACA	CAGCGTCAGG	CAGGTGCAT
4801	GCAGAGAGCA	CGCTAGAAGC	CAGCTGTGCA	GACACGGGGC	AGGGAGGTCC	CCTCTAGAAG
4861	CCAGCTGTGC	AGACGCAGGG	GACAGGGATG	GCCTCTCTGG	AAGCCAGCTG	TGCAGATGTT
4921	GGGGGCAGGG	GTGGCCCTCT	TGGAAGCCAG	CTGTGCAGGA	GTGGGGGGTG	GGGAGGCCAC
4981	TCTGAAACC	AGCTGTGCAG	ATGCAGGGGA	CAGGGGTGGC	CTCTCTGAGC	TGACCTCTGA
5041	GTAGAGAGAC	CCAAGAGAAG	TTTCTCAAAG	CATCTTATCA	AGCTAGGTAT	GGTGGTTCAT
5101	GTCTGCAATT	CCAGCACTTT	GGGAGGCCAA	GGCGAGAGGG	TCACTTGAGC	CCAGGAGTTC
5161	AAGACCATCC	TGGGCAACAT	AGCAAGACCC	CATCTCTTAA	AAAATAAAAA	TAAAAAATTA
5221	CTGGGAAATT	GTGGCAGATG	CCTGTGGTCT	CAGCTACTCA	AGGCTCTGAG	GGAGGAGGAT
5281	CCCTTGAGCC	CAGGGGTTCC	AGGTTGCAGT	GAACCATGAT	TTTGCCACTG	CACTTCAGCC
5341	TTGCTGAAGA	CCCCGTCTCA	AAAAACAAC	AACAAACAGG	CATCTTATCA	GATCTCGGTG
5401	TTGAAAGCAC	TCAGCGTAGT	CTTGCCACAG	GGAGGGTGGG	TGCGGTGTGA	GCCCGTCTG
5461	CGAAATTAGC	TGTGCTGTGT	TAACAGAGGA	CGCGTCTTCC	TGTGAGCCGG	GGTATCTGC
5521	GGCTTTCATT	TCTCGGAGGT	GCTGTTTGCC	TTGCACTTGA	CCCCAGCAA	ACCTCAGGGG
5581	TCCTTCTCAG	GCATGGCTGG	GCTGGGATCT	GGGAGGACTT	TGGCCACAAG	CTCCTAGGCC
5641	TGGAAGGTT	CTGTCTCAGC	CCTGCCACGC	CTTGCTTGGG	GTCATGGGAC	AGGCATGTGT
5701	CGCAGTTCCG	GTACCAGCCA	GTCTCTGGAG	GTCAGGCCCT	TGGGGCCCC	TCAGGGGTGG
5761	TGTGGGCCCA	GCCAGGCGGT	GCGCCTCTTC	TGATATGCC	TGAGAGTTGA	TCACGCTGGT
5821	GCCAGGGTGC	CAAGGGCTGC	AGGGCTCGGC	ACGGCCGCT	GTCCAGGGT	CAGTGTGCTG
5881	CAGGGCTGGC	CAGGCCACTC	CGCCCTCCCA	GGGACCAGG	GCCCAGGGGT	GCTCTCTGGG
5941	TGCTTCAAG	CTCGTGTGGC	CCCTGGGTG	TGAGCAAGCC	TGGCTGGCCT	TGTTCCCGCA
6001	GGCTGAACAC	GACGGTGGCG	CCCCTGTTCT	TTGCGGACCA	<b>GTTCCTTCAG</b>	<b>CTGTCCACTT</b>
6061	<b>CGCTGCCCTC</b>	<b>GCAGTATATC</b>	<b>ACAGGCCTCG</b>	<b>CCGAGCACCT</b>	<b>CAGTCCCCTG</b>	<b>ATGCTCAGCA</b>
6121	<b>CCAGCTGGAC</b>	<b>CAGGATCACC</b>	<b>CTGTGGAACC</b>	<b>GGGACCTTGC</b>	<b>GCCCACGGTA</b>	<b>CAGCGCCGGG</b>
6181	<b>CGGCGGGCGG</b>	<b>GGGCACTGAG</b>	<b>CTGGGGAGCG</b>	CAGGTGCTGA	AGCCGCTCT	CTGCACTG
6241	CCAGCCCGGT	GCGAACCTCT	ACGGGTCTCA	CCCTTCTAC	CTGGCGTGG	AGGACGGCGG
6301	<b>GTCGGCACAC</b>	<b>GGGGTGTTC</b>	<b>TGCTAAACAG</b>	<b>CAATGCCATG</b>	<b>GGTAAGCTGC</b>	<b>CCGCCGCCA</b>
6361	<b>GCGCCCGGGC</b>	<b>CGGGTCTCC</b>	<b>TCCGTGTGC</b>	CTGCCCTGGA	GACTGGAGGT	CCGCATGAGG
6421	GGCCCTGGGC	ACGGTGTGG	GCCTGTGTT	TTCTGGGAAA	TGAGTCTAT	GGCTGTATGC
6481	CTCTCCCAAC	TCTGGCCTTC	TGTGCTCCTA	AGGAGGGTTC	TGGGGCCCTG	CTGGAGGTTG
6541	GGCTGGCACC	ACATATCTTT	CCGTCCCATG	CCAGGTTCTT	CCTGAGTCAG	GCTTAGCACG
6601	GCTTCCCAAG	GCCACTCTGA	GCTCCTCTGT	GGGAGAGAGC	CTCAACTCTC	CGCCTGTGAT
6661	TGGCCCATCT	GTGGGGTGCA	GAGCCCTCCA	AGTGAAGAA	CTGTCCCCA	ACCCAGAGC
6721	TGCTTCCCTT	CCAGATGTGG	TCTGTCAGCC	GAGCCCTGCC	CTAGCTTGA	GTTCTGACAGG
6781	<b>TGGGATCCTG</b>	<b>GATGTCTACA</b>	<b>TCTTCTGGG</b>	<b>CCCAGAGCCC</b>	<b>AAGAGCGTGG</b>	<b>TGCAGCAGTA</b>
6841	<b>CCTGGACGTT</b>	<b>GTGGGTAGGG</b>	<b>CCTGCTCCCT</b>	<b>GGCCGCGGCC</b>	<b>CCCCCCCCAA</b>	<b>GGCTCCCTCC</b>
6901	<b>TCCCTGCCCTC</b>	ATGAAGTCGG	CGTTGGCCCT	CAGGATACCC	GTTCATGCCG	CCATACTGGG
6961	GCCTGGGCTT	CCACCTGTGC	<b>CGCTGGGGCT</b>	<b>ACTCTCCAC</b>	<b>CGCTATCACC</b>	<b>CGCCAGGTGC</b>
7021	<b>TGGAGAACAT</b>	<b>GACCAGGGCC</b>	<b>CACTTCCCC</b>	<b>TGGTGAGTTG</b>	<b>GGGTGGTGGC</b>	<b>AGGGGAGGCA</b>
7081	<b>AGGGGCTGGC</b>	<b>CGGGACGCGT</b>	CTCCTCAGGC	CCCAGCAGAC	GGTCCCCTGT	TGTGGCTGCA
7141	GGACGTCCAG	TGGAACGACC	TGGACTACAT	GGACTCCCG	AGGGACTTCA	<b>CGTTCAACAA</b>
7201	<b>GATGGCTTC</b>	<b>CGGCACTTCC</b>	<b>CGGCACTGTT</b>	<b>CACGAGGCTG</b>	<b>CACGAGGCGG</b>	<b>CGCCCGCTCA</b>
7261	<b>CATGATGATC</b>	<b>GTGGTGTGTG</b>	<b>CCCCACACT</b>	<b>GTGGGTCTTT</b>	<b>GGGAAGGGGG</b>	<b>CCGCCCGGTG</b>

7321	CCCAGTGGCT	CCTTCTCTGT	GCAGCGTCAT	CCTCGTGCCT	GTGTGGTCCG	CGAGGATGTT
7381	TTCTGAGGGT	CTTTGTGATA	TCGAGGGAAAT	ATCAAGAAGT	TTGCAGGGCT	GGCCCCAGCT
7441	GTCCAGGGAG	GTCGGGTTTG	AGGGTCCCA	GAAATGGCCG	GGTGCTACTC	AGGGTCTGT
7501	CAGATGTAGG	TTACTTGAAC	TGCCTTAAAG	CAAAAGGCCA	GGGGCATGAT	AAACTGATGT
7561	CACCTGGTCC	TGGAAAGTGG	AGGGCCCGGT	GGGCCTGGGC	ATGGGTATCG	CTGGAACTGT
7621	GGAGGCTCCG	TGTGCCTTCT	GGCCGTGCCT	CTCCTTCTGG	CCGGCTCTGA	ATCCCTGGAA
7681	AGGACGGCGT	GAGTGAGGGC	AGCTCCAGC	CCTCATGCTG	GCACCACAGA	CCGGAGACTT
7741	CTTCCCATCA	GCTCCCATAG	AAAAGTCCCA	AAGCAGGACT	CTTGAGTCAC	CCAGCACAAA
7801	GAGGCCCTTC	CCTGAGCCAG	TCCCACAGCC	AGAAGGATGC	AGTTTGGGGG	CTGGTCCAGC
7861	CCGAGTCTGG	TGTCCGGCAC	GATGGCCAGA	GGAGGAGGTG	GGAGGCAGGG	CGAGCTGAAA
7921	AGATCCAACA	GTTCCTGCC	GGAAGATCCA	CTTCAGCAGA	GGAAAGCACAG	ATGAGATGTG
7981	GGGCTGTGCT	GATGCTGCCT	GTTTCCATCC	CTGCCTTCTG	CAGGCAGCAA	ACAGTAGTAG
8041	CCCTTAAGAG	CAGGAGTGGA	AACACAGACT	TTTTTCTTTC	TCACATTTT	TTAATTATAA
8101	AAGAAAAGTG	ATTACTGTAG	AACACTGGG	AAACTCTAGA	GGTTTAAAGA	AAAGGTAAAG
8161	GTAAGGCTTC	CATTCGGCG	CGCCCTCAT	CAGCCAGCTG	GTCCTGACTC	CGCCGCGCT
8221	GGCTCCTCTC	CAGGCAGGCG	TGTGCAGGCA	TGTGCAGGTA	CACAGGCAGG	CATGCTGTAC
8281	ACACGCATGA	TGTCATCCCC	AGCCTCATCC	TCTCACTGTC	TCAGTTTTCC	CCGTGGCTGG
8341	CGCAGGGTCC	CTGGGCCACC	CTCACCTTGA	CAGGTTTCCC	TCTTCCCAGG	ATCTGCCAT
8401	CAGCAGCTCG	GGCCCTGCCG	GGAGCTACAG	<b>GCCCTACGAC</b>	<b>GAGGGTCTGC</b>	<b>GGAGGGGGT</b>
8461	<b>TTTCATCACC</b>	<b>AACGACAGCG</b>	<b>GCCAGCCGCT</b>	<b>GATTGGGAAG</b>	<b>GTATGGGAGG</b>	<b>GGTCCAGGGG</b>
8521	<b>ACGGGGGTTA</b>	<b>GAAAGCAGAG</b>	<b>GCCTCCAGCC</b>	AGGGGGAGCC	GGCAGCTGCT	CAGGAAAGACG
8581	GTGGGATTTG	AGGAGCCATC	ACGCCCAGTG	GGACAGCTGA	GAGGAATGGG	CCACAGTGGC
8641	CCGTGACGAT	GGTGGCTCCT	ACAAGGAATG	GCCCCGTGAG	TTCTTCCATC	AGCAGGCCTT
8701	TGACTTCAATG	GGCAGCTGGG	CCTGGCCAG	GCACAAGCCC	TTCAGACCTT	CAGTGAGGCC
8761	TTAGGGTCTC	CCTTGTCTCT	CCAGCCCCC	AGGGGCCTCC	AGGCAGGGCC	CCCCTGAGG
8821	GAGCAGCTAG	GGAGGGTCTG	GTGCGGATGT	GAGGCTGCCT	GGCAGGGCTT	GCACGGGGCC
8881	GTCTCCGCTG	CCCTTCTCCC	TGACGCTCTC	TGGTTCTGCA	GCCCCCCCC	TGGGTGGACG
8941	TGTTGGGGGT	GACCCCTCGT	TTTCCCAGGG	TTGAGGCCCC	TTGAGGCCCG	ATCAGTCCAT
9001	TGTGGAGAAA	GAGCTGTCTA	TTGACCTCCA	GGGTGCAGGT	CTCTCAGATT	TGCAAAATGTG
9061	GGCGTCCACT	AAGAGTGAGG	CTGCCCTTCT	GCTCAGGCTG	AGGCTCAGTG	GGGCTTCCAT
9121	GCAGGCCCTG	GGTGGGGCCG	GGTCTCCCCA	CTGCAGCCTC	TCGTTGTCCA	GGTATGGCCC
9181	GGGTCCACTG	CCTTCCCCGA	CTTCAACAA	<b>CCCACAGCCC</b>	<b>TGGCTGGTG</b>	<b>GGAGGCATG</b>
9241	<b>GTGGCTGAGT</b>	<b>TCCATGACCA</b>	<b>GGTGCCTTCC</b>	<b>GACGGCATGT</b>	<b>GGATTGTAAG</b>	<b>TGTGGCCCCC</b>
9301	<b>TCCTGAGCAT</b>	<b>CCCCAAGGCC</b>	<b>TCTGGGACT</b>	ACCCACCTT	CCTCACTCTG	GGCAGAGTCA
9361	CCTACCAGCA	CGGCTTCTCT	TGCAGGACAT	GAACGAGCCT	TCCAACCTCA	TCAGGGGCTC
9421	TGAGGACGGC	<b>TGCCCAACA</b>	<b>ATGAGCTGGA</b>	<b>GAACCCACC</b>	<b>TACGTCCCTG</b>	<b>GTCAGCTCG</b>
9481	<b>CCCCACCTA</b>	<b>CCCTGGGGAC</b>	<b>TTAATCAAAT</b>	<b>CAGAGACTCC</b>	CTTGTCTGGC	CTGGGAGACT
9541	TAGCACCTC	ATCTCTGAGA	AGCAGATGGG	CCAGCGGGGA	AAGGGGCGGG	GGGGGATCC
9601	CCAGGAGAAA	GGCTCAGGCT	GGGAGACTCA	GCCAAGCAGT	GCAGACAGGG	TGGGTGCAGA
9661	GGCAGAGGCC	CTGCCGGAGG	AGACCGGCT	GCACAGGTGCT	TGCCAGGACA	CAGTGAGCC
9721	GACTCGACTC	AGAGCCGTCT	CGATAGGCGC	AGGGACCATG	CAGCGGAGAC	CTACCCACCC
9781	GTGGGGAGAG	GTCAGGCCCA	ACTCGAATGC	AGCACGGGCA	AGTGGATTTC	TAGCCAGGGA
9841	GCAGGGTGGG	CTCAGAGGCA	GGAATTACCA	AGAAGAAGCA	TGGGGGTGAG	GGGGATTCTG
9901	GCTGAAGTGA	CCCAGCAGGA	TTCTTGTA	AGGCAGGCCA	GGGTGACCAG	ACATGCCCTG
9961	AGGGGTGGTG	GAGGTTGGGG	CTTCTCGCCA	AACTGTCTTA	GCAGGAATGG	CAGAAACTGG
10021	GTTTTACAAG	GAAGTACAAG	GATGGGCTTG	GGAGAAGGTT	TGGGGGCTG	AGGCTATAGT
10081	TTGGCCCAGC	AAAGAAATCAG	TGAGAGGATG	GGGTTTTGGG	CTTAGGTA	CAGGCAGGGG
10141	AGTGCTTGAA	ATGGGCCAAG	AGACGGTGA	TGTGAAGTCT	GGGGGTCTGC	AGAGCCAGG
10201	CTCCAGCACC	CGCCAGCCC	TGCTTAGAA	GCAGTGGAGA	TGATTACCCA	GGTTCGGGG
10261	TAACGCCAGC	CCCACAGAGG	CGTGGGGAGC	GGCTGCAGGT	GCACCTCCAG	GGCCAGCCTG
10321	AAGAGGCAGC	GACCTGCACA	GGGGCTCTG	GGAGGTGGGG	GGCAGGGAGG	GCACCTTGA
10381	GCCTGCCGGG	AGGAAGCTCC	CTGGAACCA	GCCCCCGCT	CTTCCAGGGG	TGTTGGGGG
10441	GACCTCCAG	GCGGCCACCA	TCTGTGCTC	<b>CAGCCACCAG</b>	<b>TTTCTCTCCA</b>	<b>CACACTACAA</b>
10501	<b>CCTGCACAAC</b>	<b>CTCTACGGCC</b>	<b>TGACCGAAGC</b>	<b>CATCGCCTCC</b>	<b>CACAGGTGAG</b>	<b>GGCCACGTCC</b>
10561	<b>CGCCCCACTG</b>	<b>GGCTCTGCC</b>	<b>TCACAGCCTG</b>	TCCTACAAGG	TTGGGGCCTC	TGCAGGGCCT
10621	CAGGGAGGAG	GAAAAGCGGA	GGCCAGACC	ACCCGGGGCC	CGCTGGCGGC	CCGAGTGCTC
10681	TCCCCACCCG	CTGCCAGCAC	CCCAGCTGA	AGCTGGAGCG	CTCCTCCCA	CTCATGCCT
10741	GGGGCTTGGA	GAGGAAGGAC	CCTGGATGCT	GACAGGAGTC	TGCATCAGCG	GGGACCTCAT
10801	GACTCCTGTG	AGGCTGGGGG	GGGTCTGGC	TCACCTACAG	GCATCAGGTG	GCCACAGACG
10861	AGGCAACTGT	GCCCCAGAG	ATGGGCAGTA	GCCTCGCCGT	CCTCCTCCCC	AGCCTCTGCC
10921	TCATCCCAGA	AAGCTCCTTG	CTCCAGCTC	TGCCCTGCTG	GTGACAGGGT	TCCCAGTGA
10981	CCCCGCTCCA	CACAGCCCTC	ACGGTGTCCC	CCACCACCC	AGGGCGCTGG	TGAAAGGCTCG
11041	GGGGACACGC	CCATTTGTGA	TCTCCCGCTC	GACCTTTGCT	GGCCACGGCC	<b>GATACCCGG</b>
11101	<b>CCACTGACG</b>	<b>GGGACGCTG</b>	<b>GGAGCTCTG</b>	<b>TGAGCAGCTC</b>	<b>GCCTCTCCG</b>	<b>TGCCAGGTGA</b>
11161	<b>GCTCCTACCA</b>	<b>GGAGGGGCTG</b>	<b>CACAGCAGAG</b>	<b>TAGAGCCGGG</b>	<b>GGCCTCTATG</b>	<b>GGAGGCTTGC</b>
11221	CGGGGCCCCC	CACCCACTTA	GCAGGTGGGG	CTCTGGGTCA	CTTGGCCTGA	GCTGGCTCTG

11281	CTGCAGCAGC	CTGAGGACCA	GCCTGACTCT	GCCCTCCAG	AAATCCTGCA	GTTTAACCTG
11341	CTGGGGGTGC	CTCTGGTCCG	GGCCGACGTC	TGCGGCTTCC	<b>TGGGCAACAC</b>	<b>CTCAGAGGAG</b>
11401	<b>CTGTGTGTGC</b>	<b>GCTGGACCCA</b>	<b>GCTGGGGGCC</b>	<b>TTCTACCCCT</b>	<b>TCATCCGGAA</b>	<b>CCACAACAGC</b>
11461	<b>CTGCTCAGTC</b>	<b>TGGTAGGGTG</b>	<b>GGGGTGGCGG</b>	<b>CATGGCAGGT</b>	<b>GGGCGATCCC</b>	<b>ACCCACCCAA</b>
11521	<b>GACTCTCCCC</b>	TGGGAATCCC	ACCCCTGCTG	GAGAAGCACC	CCATGCTGGG	TGGCTGAGAA
11581	GTGCAGCTCT	CCCGAGGCGG	GGACTCCAGG	GGACCGCGGC	CCCAGCACCC	AAGTGCTTCC
11641	TTTGCCCTCC	CCTGCCCTGC	AGCCCCAGGA	GCCGTACAGC	TTCAGCGAGC	CGGCCACGCA
11701	GGCCATGAGG	AAGGCCCTCA	<b>CCCTGCGCTA</b>	<b>CGCACTCCTC</b>	<b>CCCCACCTCT</b>	<b>ACACACTGTT</b>
11761	<b>CCACCAGGCC</b>	<b>CACGTGCGGG</b>	<b>GGGAGACCGT</b>	<b>GGCCCGGCC</b>	<b>CTCTTCCTGG</b>	<b>AGTGAGTGAC</b>
11821	<b>CTAGGCAGGG</b>	<b>GCGGTGGCCC</b>	<b>ATGTGTGCCC</b>	<b>TGGGGGAGGG</b>	<b>GCACGTA</b>	CCCAGGCAGC
11881	CCTGTCTGTC	TGTGGGCTGT	GTTCCTCCAG	ACCCAGCAGG	TTGCGCTGA	GTGAGACAAC
11941	ATTTGGGCCCT	GGCTTAAGGG	GGAAGGGCAG	CAAGAAAACC	CAGTAATATC	CCCCAGACAG
12001	GCCGTAGTAC	ACACGAGGAG	TTCCTAACAA	CAGCCTGCA	CATCAGTGTG	TTGAGGGAGG
12061	ATTTCCAGAG	AGTGAGGTGA	TTAGTTAACT	ATTTGCAGAA	GTCAATTTAT	TTTTCTTGCA
12121	TACCATAGAA	ACATAAGTTC	CAGATAAATT	AAATAGTTAA	TGTCAAAAAT	CAAGCTGTGG
12181	AGGCCAGGCA	CGGTGGCTAA	CGCCTGTAAT	CCCAGAACTT	TGGGAGGCTG	AGGCGAGTGG
12241	ATCACCTGAG	GTCAAGAGTT	CGAGGCCAGC	CTGGCCAACA	TGGTAAAACC	CATCTCTACT
12301	AAAAATACAA	AAATTAGCCG	TGCATGGTGG	TGGGCGCCTG	TAGTCCTGTC	TACTCAGGAG
12361	GCTGAGGCCA	GAGAATCCCT	TGAACCTGGG	AGGAGGAGAT	TGCAGTGAGC	CGAGATCGCG
12421	CCACTGTACT	CCAGCCTGTG	TGACTCCATC	TCAAAAAAAAA	AAAACCAAGC	TGTGAAAGAC
12481	TCCACAGGAA	AAGATAAGTG	AATGTGTATC	TCTGGGGAAA	GGTTTCATTT	AGAGAAAAAA
12541	AAAAAAAAAAAA	GGTGAACTTT	ATTTGACCAT	AGCAGAAAAA	AAAATGTAAA	TCTCTGAATA
12601	TAAACACAAA	AAGATTAATA	CTGCTCTGAA	CATGGACTGT	AACAGCAGAG	AAGGCATTTG
12661	CAATAAAAACA	GCAAAATAGCT	GACTTCCCTA	ATAGGTAGAG	AACTCATACG	TTGGTAAGAC
12721	CAAGACTAAG	AACCAAATTG	GAGGAACT	GTTTGCAAAA	CAGGAGATAC	GAATGGTATC
12781	CACACATTCT	TCACCCGGAA	ATCCAAGAAA	CGCAATTTGT	GTTTTAATTA	CTATTTTAAT
12841	GACCTTGTGG	TTTTGTTCAC	TACACTTTTT	TTTTTTTTTT	TTTAGTGGTT	GCCCTAGGGA
12901	TTACAATTA	CATCTTAATT	TTAGCCTCGT	TGGAACGTAT	GCCCACTGTC	TTCAATAGC
12961	ATAAAAAAGC	TTTGTCTCTA	TGTGGTTTTCC	ATTGCCTCTC	GTTCTCTGTC	GCTGTTACAC
13021	GTCTGTATCC	ATGATGAGCC	CATCCACGCA	GATTTATAAT	GACCCCTTA	TTCAATTATC
13081	TTTTAAGTCA	AATAGGAGGG	AAAAATGGGT	TACAAAACAA	AAATACATAC	ACACTGTCTG
13141	CCTTTTATAT	TTACTGATGT	AGTTACCTTT	ACCCATGGTT	TAGTACTATC	ATGTGGCTTT
13201	GACTTCTTGT	CTAACATCTT	TCATTTACAG	CAGAAGGACT	CCCTTTAGTA	TTTTATTGTAG
13261	GGCAGTCTGT	CTAGTGATGA	ATTCTCTCAG	TTTTGTGTGA	CTTCAGAGTC	TCTTAATTTT
13321	TCCTTCAATTT	TTTGAAGTTT	CTGCTCAACG	TAGGGTTCTT	GACTGGCGGT	CGTTTCTCTG
13381	AACACTTTGA	ACTGTTCAGC	CCATGGCCCT	CGTGGTTTCT	GCTGAGTAGC	TCTGTCTTTG
13441	CCTCTTCCCA	GATTCTCTGT	CTTTGGCCCT	TGAAGTCCCG	ATGGTGTGTC	TAGGTGTAGA
13501	TCCTTGAGTT	TATCTTACTG	GGAGTTTGT	GAGCTTCTTG	GACGTATGCA	TTGATGTTTT
13561	TACTCAAAT	TGGGCGGTTT	TTCAGCCATT	ACTTCATAAA	ATATTTTTTC	TGCCCTTTT
13621	TGCTTCTTAC	TCTGGGACTT	CCGTCCACA	CATGGGTATG	CTTGAGGCTG	CCCAGGGGTC
13681	TTTGCAGCTC	TGTTGACTCC	TTCTCTGTTG	TGTTTTCTTT	CTGTCTTCA	GACTGCTTAG
13741	TCTGACTGCC	CTGTCTCAA	GGTCACTGAT	TCTTTTTTCC	ACCAGTCTC	ATCTGCTGTT
13801	GAGCCCTCT	AGTGAACCTC	TCATTTTAGT	TGCTCTCTTT	TCAACTCCAG	AATTTCTGTT
13861	TCAITTCCTT	ACGTTTTCTT	CGTTAAGGAT	ATTCCCTATC	TGGTGAGTCA	TGTTCTACAC
13921	CTTTCTTTA	GTTCTTACAGA	CACGGTTTCG	CTGAGCTCTT	TGAACACATT	TAAAGTAGCT
13981	GACGTAAACT	CTTTGTCTAG	TAAGTCCAAT	GTCTGGGCTT	CTCTAGGGAC	AATTTTTTATT
14041	AACTACTGTC	CCCCCATCTG	TGGGCCATAC	TTTCTTGTTT	CTTTGCGTGT	CTCATACATT
14101	TTTGTTTCTAG	ACTGGACATT	TTAAACGCAG	CTGCTGTGGT	CATCAGATTC	CCCATGGCCC
14161	TCAGGTTCTG	TTGCTAATGC	TGATTGTTTT	GTGACTTTCT	TGAGCTAATT	CCATAAGGTC
14221	TGTGTCTTTC	ATTGTGTGTG	GCCACCAAAG	TCTCTGCTTG	ACTAGCTTAG	TGGACAGCCA
14281	ATAATTGGTC	AGATATCCTT	CACAGATGGC	ATCCGTGAGT	CTCCAGCCT	TTGTGGGGC
14341	GAGGTGGGGA	GCACCGTCAA	CACCTAGCTA	GGCCAAGGAT	TCTTGCTGTT	CTTACAAAAG
14401	TTCAGCCATT	TTGTTAAATA	CATGCTCCCC	AGATGGCTGC	AAACCTTGG	TTAGTTTCAA
14461	GAGTCTTAAA	AATGTCAACT	CTGACCATTT	TTGCCGATGT	TCCTGTTTTT	ACAGAGGAGA
14521	GGATCTTGAG	AGGGGCTTAC	TCCACCATCT	TCACTGACAT	CACCTCAAGA	AATGTATTTT
14581	GCAAGAAATA	TTTTGAAGCA	GAAAGACACC	ATTTATTTTG	CCCATGAATT	AGAATACATT
14641	AGAGAAAATA	AGACTATCCC	TTGCTGGCAA	GAACACAGTG	ACACAGTAGG	ACAGGAATATA
14701	AATTGGCACA	TTTGTGGAAA	GCAACAGTAC	ATATCAGTCA	ATGTTTTTGA	GATTCACATT
14761	GATGCGTTAA	TTTTACAAAT	AGAAATAGGG	CCTAAAGAAG	TCACCTCAAA	AGGCATGAAC
14821	GCTCCATGAA	TGTATCCATG	CAGGGATCAT	AGCTGAGCAC	TGGATGCCCC	CTGCACGCTC
14881	GGGGGACGGA	AACAGGACAG	GCGAGAGCTG	CGTCACAGGG	CAGGACAGTC	TCCGTTAGAC
14941	GGAGAATCCT	CCGTAGAGCT	GCTTGCACAT	GTACATTCAT	CTTTTTGTCA	GATGTTAATT
15001	CAAGTTGCCT	TTGGTTGTGG	GACTGGGAGG	ATCTTTTCTC	TTTGTGATA	CTTTTTCGTA
15061	CTTTCCAAAT	ACTTGACTGA	TGAGCACATG	CTGCCTTGGT	TACCGGAGGA	TAAGTGAGCG
15121	AGCAAAGTGA	GGCCAGTGCT	GTGTCCATCC	TGGTGCCTCA	AGCACAAGCC	CCATTTCTGT
15181	CCCTGAGCCC	AGCTGCCGGC	ATGTCCGGGG	AGAAGGCTTC	TCCCAGCTCC	GGCATTGACT

15241	TCTATCTGCT	GGAATCATCC	CTGCCCGTCT	GACCTGAGTC	CTCCAAGTCC	TCCGGCACCT
15301	TGAGCTCCAG	AGAGCAGAAT	TCAGCCTCTT	CCTGTGCCTC	CCCAGGGTGG	GCATATGAGC
15361	CAGCCCCATC	CCATTCATCA	CCCCTATGCC	TGTGTGCCCA	TCCCCCTTGC	AGGTTCCCCA
15421	AGGACTCTAG	CACCTGGACT	GTGGACCACC	AGCTCCTGTG	GGGGGAGGCC	<b>CTGTCTATCA</b>
15481	<b>CCCCAGTGCT</b>	<b>CCAGGCCGGG</b>	<b>AAGGCCGAAG</b>	<b>TGACTGGCTA</b>	<b>CTTCCCCTTG</b>	<b>GGCACATGGT</b>
15541	<b>ACGACCTGCA</b>	<b>GACGGTGAGT</b>	<b>CTGGGGACCC</b>	<b>TAAGCCCTGG</b>	<b>GGAGACGGGA</b>	<b>GACCAGAGCA</b>
15601	<b>GCCCTCCAC</b>	CTGCCCCCTC	CACCCAGTTG	GTGTGACCAG	GTGGCGGAAA	GAGGAACGTA
15661	TGTGTTGAGT	CCC GGCCATG	TGCCAGGCC	CCACCCGGCT	GCTCCGCACC	CATCAGCCTC
15721	TCCGCTCCTC	ACACCATCCC	CATTTCCCAG	ATGAGCAGAC	TGAGGCCTGC	TTGCAGAACC
15781	TGGCCAAGTC	CCACGGCCAT	CACAGGCTGT	GCCTGTGCTG	AGTGGCATA	CCCAGGCCTC
15841	TCAGGCACTG	TCCCCACTCA	GTAGCCAGGA	GGGTCCCTAC	CTACAGTGAG	CCTGAGTCT
15901	GCGCCTGAAG	TCACAGTTCA	GCCCCGTCTG	GCCAGGCCTC	CTAGGCCTCC	ACGTGGAGCC
15961	CCGGGAGATG	GAGAGCGTGG	TTCCTGAGGA	CAGCATGGGG	GCCTCGGCAC	GGCCAGAAT
16021	CCTCAAAGCA	ACATCTCCCT	CCAGGTGCCA	GTAGAGGCC	TTGGCAGCCT	CCCACCCCA
16081	CCTGCAGCT	CCCCTGAGCC	<b>AGCCATCCAC</b>	<b>AGCGAGGGC</b>	<b>AGTGGGTGAC</b>	<b>GCTCCCGCC</b>
16141	<b>CCCTGGACA</b>	<b>CCATCAACGT</b>	<b>CCACCTCCGG</b>	<b>GCTGGGTACA</b>	<b>TCATCCCCCT</b>	<b>GCAGGTACCT</b>
16201	<b>GGGCCAGGCG</b>	<b>GCTATGGTGG</b>	<b>GGGTGTGGAC</b>	<b>AGCACACTGC</b>	<b>AGAGCTGGGG</b>	<b>GAGGCACAGG</b>
16261	GAGATGGTGG	GGGAGAGGCC	CAGGTGGGGC	TTCTGAGGGG	CCGCCCCCCG	CAGTGTAGGT
16321	TATCAAGGAG	CCAGCCAGGC	CAGTGAGGTG	GGGAGGGCAC	AGCCCCACAA	AGGCGTGGAG
16381	CATGGCCGGC	AGGAGCTCAG	TGGTCTGCAT	GGTGGAGGTT	CTGCCGGGCC	CGGCCTCGGG
16441	CAGCCGTGGG	ATAGCACTTG	AGGTGGGGAA	GGTCTTGGGT	CATCACCACG	GGGTTCACG
16501	CCCTGCGGCC	GCAGGTGTTT	CTGCAGATCC	TAGTTACTGG	CAGCTGGTGT	CTGTACCAGC
16561	CTAGCATTCC	CGGGCCCTGG	AGGCCTCCAC	CTCCACCAGG	GTGGGGATGA	TGACATCACG
16621	TGTCCCTCCC	TTTCCAGGGC	CCTGGCCTCA	CAACCACAGA	GTCCCCCAG	CAGCCCATGG
16681	CCCTGGCTGT	GGCCCTGACC	<b>AAGGGTGGGG</b>	<b>AGGCCCGAGG</b>	<b>GGAGCTGTTC</b>	<b>TGGGACGATG</b>
16741	<b>GAGAGAGCCT</b>	<b>GGAAGTGCTG</b>	<b>GAGCGAGGGG</b>	<b>CCTACACACA</b>	<b>GGTCATCTTC</b>	<b>CTGGCCAGGA</b>
16801	<b>ATGTGAGTCC</b>	<b>TGGGGCTGCT</b>	<b>CAGGCTGGTG</b>	<b>GGCAGGGGCC</b>	<b>GGCTCGGGGT</b>	TGAGAAAGGGG
16861	TGAGGGGACC	TGGGCTTGGG	GGTCCCACGA	TGGCTACCTG	CTGCTACCTG	ACTCTAGCAG
16921	GTGGCCTGGG	GTCCTAGAGT	GAGCAGTGGG	GCCGTGCACT	CTGCCCTTTC	GTGTACACAG
16981	AGGGAGGTCA	CCTCCCTGAT	GCCATCATGA	GTCCCTGTTC	TCATGGGTGT	TCCTGCCCCA
17041	GCTGTCTGCT	GACACCTCCA	CATTCTCTGC	CTTTTTCATCT	CTCTCTGCTC	GGCCAGAAC
17101	ACGATCGTGA	ACGTGTGACC	ACGTGTGACC	AGTGAGGGAG	CTGGCCTGCA	GCTGCAGAAG
17161	<b>GTGACTGTCC</b>	<b>TGGGCGTGGC</b>	<b>CACGGCGCCC</b>	<b>CAGCAGGTCC</b>	<b>TCTCCAACGG</b>	<b>TGTCCCTGTC</b>
17221	<b>TCCAACCTCA</b>	<b>CCTACAGCCC</b>	<b>CGACACCAAG</b>	<b>GCAAGAGGGC</b>	<b>CCAGAGTGGC</b>	<b>ACAGGGATCG</b>
17281	<b>CGTCCCCCAG</b>	<b>CCGTGGTGCA</b>	<b>GGGGGCA</b>	GGTGCTGGGC	GTCCTGGTGA	CCGATGCCAG
17341	GAACAGAGGA	TGCTGGGACC	TCCCAAGGGG	GTCTTTGGGG	AGGAGTGGGA	AGGGTCAGGC
17401	CACACAGGCT	GTGCCCTTTC	TCCTCCTGTG	TCTACACGTG	GGTGATGGGG	CCACAATGAC
17461	GACCTCTGAG	CCGTGTTGAA	GCAGCACCGC	GTTTCTGGCG	TGCGTTAAGG	TGACCCGCAC
17521	TGAGAGCCGG	GGTCCCCCTG	CGCTGCCCG	GGAGGAACCG	GGTGCGAAGC	ATCCAGGGC
17581	CAGACGGAGC	TGCCCCCTGA	GCGCCGGGCC	TCCGTGCTGC	TGGGATCTCG	GGCCAGATG
17641	GAGCCGCCTT	CTGAGCGCTG	GGGTCTCACT	GCTGTGGGA	TCTCGGGCTG	CTCCATTTGT
17701	GCTCTCTCTT	TTCCAGGTCC	TGGACATCTG	TGCTCGCTG	TTGATGGGAG	AGCAGTTTCT
17761	CGTCAGCTGG	TGTTAGCCGG	<b>GCGGAGTGTG</b>	<b>TTAGTCTCTC</b>	<b>CAGAGGGAGG</b>	<b>CTGGTTCCCC</b>
17821	<b>AGGAAGCAG</b>	<b>AGCCTGTGTG</b>	<b>CGGGCAGCAG</b>	<b>CTGTGTGCGG</b>	<b>GCCTGGGGGT</b>	<b>TGCATGTGTC</b>
17881	<b>ACCTGGAGCT</b>	<b>GGGCACTAAC</b>	<b>CATTCCAAGC</b>	<b>CGCCGCATCG</b>	<b>CTTGTTTCCA</b>	<b>CCTCCTGGGC</b>
17941	<b>CGGGGCTCTG</b>	<b>GCCCCAACG</b>	<b>TGTCTAGGAG</b>	<b>AGCTTTCTCC</b>	<b>CTAGATCGCA</b>	<b>CTGTGGGCCG</b>
18001	<b>GGGCCCTGGA</b>	<b>GGGCTGCTCT</b>	<b>GTGTTAATAA</b>	<b>GATTGTAAGG</b>	<b>TTTGCCCTCC</b>	<b>TCACCTGTTG</b>
18061	<b>CCGGCATGCG</b>	<b>GGTAGTATTA</b>	<b>GCCACCCCC</b>	<b>TCCACTGTGT</b>	<b>CCCAGCACCG</b>	<b>GAGAAGGGGG</b>
18121	<b>TGCTCAGGTG</b>	<b>GAGGTGTGGG</b>	<b>GTATGCACCT</b>	<b>GAGCTCCTGC</b>	<b>TTCGCGCCTG</b>	<b>CTGCTCTGCC</b>
18181	<b>CCAACGCGAC</b>	<b>CGCTGCCCGG</b>	<b>CTGCCAGAG</b>	<b>GGCTGGATGC</b>	<b>CTGCCGGTCC</b>	<b>CCGAGCAAGC</b>
18241	<b>CTGGGAACTC</b>	<b>AGGAAAATTC</b>	<b>ACAGGACTTG</b>	<b>GGAGATTCTA</b>	<b>AATCTTAAGT</b>	<b>GCAATTATT</b>
18301	<b>TTAATAAAAG</b>	<b>GGGCATTGG</b>	<b>AATCA</b>			

Localización 17q25.2-q25.3



**ANEXO II****MUTACIONES DEL GEN DE LA  $\alpha$ -GLUCOSIDASA HUMANA (GEN GAA)**

MUTACIÓN	LOCALIZACIÓN	CONSECUENCIA A NIVEL MOLECULAR	EFEECTO	AÑO DE PUBLICACIÓN
c.-82G>C	exon1	5' no codificante	desconocido	1990
c.-32-13T>G	intron1	Error de splicing	potencialmente leves	1994
c.-32-3C>A	intron1	r.spl?	menos grave	2008
c.-32-2A>G	intron1	r.0?	muy grave	2008
c.3G>A	exon2	p.Met1?	muy grave	2008
c.18_25del	exon2	p.Pro6fsX34	muy grave	2009
c.25delT	exon2	p.SerfsX33	muy grave	2008
c.32G>A	exon2	p.Arg11Gln	no patógenos	2008
c.118C>T	exon2	p.Arg40X	muy grave	1997
c.148_859-11del	exon2	p.Glu50HisfsX37	muy grave	2007
c.136T>C	exon2	p.Ser46Pro	desconocido	2009
c.172C>T	exon2	p.Gln58X	muy grave	1999
c.236_246del	exon2	p.Pro79ArgfsX12	muy grave	2006
c.258dupC	exon2	p.Asn87fsX9	muy grave	1998
c.271G>A	exon2	p.Asp91Asn	presumiblemente no patógenos	1990
c.271del	exon2	p.Asp91fsX51	muy grave	1998
c.307T>G	exon2	p.Cys103Gly	potencialmente menos graves	2004
c.309C>A	exon2	p.Cys103X	muy grave	2004
c.424_440del	exon2	p.Ser142LleufsX29	muy grave	2010
c.324C>T	exon2	p.Cys108Cys	no patógenos	1990
c.340_341insT	exon2	p.Lys114fsX32	muy grave	2004
c.343C>T	exon2	p.Gln115X	muy grave	2007
c.363G>A	exon2	p.=(Gln121)	no patógenos	2008
c.377G>A	exon2	p.Trp126X	muy grave	2006
c.378_379del	exon2	p.Cys127LeufsX18	muy grave	1998
c.399C>A	exon2	p.Tyr133X	muy grave	2004
c.421C>A	exon2	p.Leu141Met	potencialmente menos graves	2008
c.447G>A	exon2	p.Thr149Thr	no patógenos	2008
c.457_465del	exon2	p.Thr153_Thr155del	muy grave	2008
c.461G>C	exon2	p.Arg154Pro	menos grave	2008
c.482_483del	exon2	p.Pro161fsX15	muy grave	1997
c.506T>C	exon2	p.Leu169Pro	desconocido	2007
c.510C>T	exon2	p.Asp170Asp	no patógenos	2004
c.525delT	exon2	p.Glu176fsX45	muy grave	1994
c.532C>T	exon2	p.Arg178Cys	no patógenos	2008
c.546G>A	exon2	leaky splice	potencialmente leves	2004
c.546G>C	exon2		desconocido	2007
c.546+1G>T	intron2	r.0?	muy grave	2008

c.546+24G>A	intron2	No involucrado	no patógenos	2008
c.546+5G>T	intron2	No codificante	desconocido	2010
c.547-4C>G	intron2	No involucrado	no patógenos	----
c.569G>A	exon3	p.Arg190His	potencialmente menos graves	2008
c.572A>G	exon3	p.Tyr191Cys	potencialmente menos graves	2008
c.573C>A	exon3	p.Tyr191X	muy grave	2002
c.596G>A	exon3	p.Arg199His	no patógenos	1990
c.623T>C	exon3	p.Leu208Pro	potencialmente menos graves	2000
c.642C>T	exon3	p.Ser214Ser	no patógenos	1990
c.634G>T	exon3	p.Glu212X	muy grave	2009
c.655G>A	exon3	p.Gly219Arg	potencialmente menos graves	1997
c.650C>T	exon3	p.Pro217Leu	desconocido	200
c.668A>G	exon3	p.His223Arg	no patógenos	1995
c.670C>T	exon3	p.Arg224Trp	menos grave	2003
c.671G>C	exon3	p.Arg224Pro	desconocido	2010
c.685_686insCGGC	exon3	p.Arg229fs	muy grave	2006
c.692+1G>C	intron3	r.0?	muy grave	2006
c.692+5G>T	intron3	r.spl?	desconocido	2008
c.693-49C>T	intron3	No involucrado	no patógenos	2007
c.710C>T	exon4	p.Ala237Val	desconocido	2005
c.716del	exon4	p.Leu239fsX29	muy grave	2004
c.722_723del	exon4	p.Phe241fsX88	muy grave	2008
c.725C>T	exon4	p.Ala242Val	potencialmente leves	2008
c.742delC	exon4	p.Leu248ProfsX20	muy grave	2008
c.743T>C	exon4	p.Leu248Pro	potencialmente menos graves	2008
c.752C>T	exon4	p.Ser251Leu	no patógeno?	2008
c.761C>T	exon4	p.Ser254Leu	no patógeno?	2008
c.766_785delinsC	exon4	p.Tyr256fsX6	muy grave	1998
c.768dupT	exon4	p.Ile257TyrfsX73	muy grave	2008
c.776G>T	exon4	p.Gly259Val	potencialmente menos graves	2008
c.784G>A	exon4	p.Glu262Lys	potencialmente menos graves	1997
c.794delG	exon4	p.Ser265IlefsX3	muy grave	2008
c.796C>T	exon4	p.Pro266Ser	potencialmente leves	2006
c.811A>G	exon4	p.Thr271Ala	desconocido	2010
c.828_850del	exon4	p.Thr277fsX45	muy grave	2003
c.852G>A	exon4	p.=(Ala284)	no patógenos	2007
c.853C>T	exon4	p.Pro285Ser	potencialmente leves	2008
c.854C>G	exon4	p.Pro285Arg	potencialmente leves	2002
c.858+5ins7	intron4		desconocido	2007
c.858+6G>A	intron4	No codificante	no patógenos	2008
c.858+8_858+14del	intron4	No involucrado	no patógenos	2008

c.858+9_858+15del	intron4	No involucrado	no patógenos	2008
c.858+18insG	intron4	No codificante	no patógenos	2003
c.858+21C>G	intron4	No codificante	no patógenos	2003
c.858+24ins7	intron4	No codificante	no patógenos	2008
c.858+30T>C	intron4	No codificante	no patógenos	2008
c.858+37C>T	intron4	No codificante	no patógenos	2008
c.871C>T	exon5	p.Leu291Phe	menos grave	2008
c.872T>A	exon5	p.Leu291His	menos grave	2008
c.872T>C	exon5	p.Leu291Pro	menos grave	2008
c.875A>G	exon5	p.Tyr292Cys	potencialmente leves	1999
c.877G>A	exon5	p.Gly293Arg	potencialmente me- nos graves	2004
c.885C>G	exon5	p.His295Gln	potencialmente leves	2008
c.893A>C	exon5	p.Tyr298Ser	desconocido	2008
c.896T>G	exon5	p.Leu299Arg	potencialmente me- nos graves	1995
c.896T>C	exon5	p.Leu299Pro	potencialmente me- nos graves	2008
c.921A>T	exon5	p.Ala307Ala	no patógenos	1993
c.923A>C	exon5	p.His308Pro	potencialmente me- nos graves	2004
c.923A>T	exon5	p.His308Leu	menos grave	2000
c.925G>A	exon5	p.Gly309Arg	potencialmente me- nos graves	1998
c.935T>G	exon5	p.Leu312Arg	potencialmente me- nos graves	2004
c.953T>C	exon5	p.Met318Thr	potencialmente me- nos graves	1991
c.953T>A	exon5	p.Met318Lys	potencialmente me- nos graves	2008
c.955+2T>G	intrón5	r.0?	muy grave	2008
c.955+12A>G	intrón5	No codificante	no patógenos	1995
c.956-84T>C	intrón5	No involucrado	no patógenos	2008
c.971C>T	exon6	p.Pro324Leu	menos grave	2000
c.988T>G	exon6	p.Trp330Gly	potencialmente me- nos graves	2006
c.989G>A	exon6	p.Trp330X	muy grave	2003
c.1003G>A	exon6	p.Gly335Arg	potencialmente me- nos graves	2008
c.1040C>G	exon6	p.Pro347Arg	desconocido	2008
c.1051delG	exon6	p.Val351CysfsX41	muy grave	2008
c.1062C>G	exon6	p.Tyr354X	muy grave	2008
c.1064T>C	exon6	p.Leu355Pro	potencialmente me- nos graves	2004
c.1075G>A	exon6	p.Gly359Arg	desconocido	2007
c.1075+13C>T	intron6	No involucrado	no patógenos	2007
c.1076-22T>G	intron6	p.Asp319_Val358del insGlySerArgArgTrp ProAla	potencialmente leves	1997

c.1076-1G>A	intron6	r.0?	muy grave	2008
c.1076-1G>C	intron6	r.1076-79_1195+89ins	muy grave	2006
c.1082C>T	exon7	p.Pro361Leu	potencialmente menos graves	2003
c.1099T>C	exon7	p.Trp367Arg	potencialmente menos graves	2006
c.1100G>A	exon7	p.Trp367X	muy grave	2007
c.1115A>T	exon7	p.His372Leu	potencialmente menos graves	2004
c.1120T>C	exon7	p.Cys374Arg	potencialmente menos graves	2004
c.1124G>T	exon7	p.Arg375Leu	potencialmente menos graves	2008
c.1128_1129delinsC	exon7	p.Trp376CysfsX16	muy grave	2008
c.1129G>C	exon7	p.Gly377Arg	potencialmente menos graves	2006
c.1134C>G	exon7	p.Tyr378X	muy grave	2008
c.1165delG	exon7	p.Glu389ArgfsX3	muy grave	2008
c.1192dup	exon7	P.Leu398fs	muy grave	2007
c.1194+2T>A	intron7	r.0!	muy grave	2006
c.1194+2T>C	intron7	r.0?	muy grave	2008
c.1195-44G>A	intron7	No involucrado	no patógenos	2008
c.1195-19_2190-17del	intron7	p.Asp399fsX6	muy grave	2002
c.1195-15G>A	intron7		desconocido	2007
c.1195-8G>A	intron7	r.spl?	desconocido	2008
c.1195-2A>G	intron7	r.0?	muy grave	2009
c.1202A>G	exon8	p.Gln401Arg	potencialmente menos graves	2008
c.1203A>G	exon8	p.Gln401Gln	no patógenos	1990
c.1204T>C	exon8	p.Trp402Arg	potencialmente menos graves	1990
c.1209C>G	exon8	p.Asn403Lys	desconocido	2010
c.1210G>A	exon8	p.Asp404Asn	potencialmente menos graves	2006
c.1214T>C	exon8	p.Leu405Pro	potencialmente menos graves	2004
c.1222A>G	exon8	p.Met408Val	potencialmente menos graves	2002
c.1229C>T	exon8	p.Ser410Phe	no patógenos	2008
c.1239C>G	exon8	p.Asp413Glu	desconocido	2008
c.1309C>T	exon8	p.Arg437Cys	menos grave	2003
c.1316T>A	exon8	p.Met439Lys	potencialmente leves	2006
c.1326+1G>A	intron8	r.0	muy grave	1998
c.1327-18G>A	intron8	No codificante	no patógenos	1995
c.1327-2A>G	intron8	Defecto de splicing	muy grave	2008
c.1333G>C	exon9	p.Ala445Pro	potencialmente menos graves	2006
c.1364A>C	exon9	p.Tyr455Cys	desconocido	2007

c.1364A>T	exon9	p.Tyr455Phe	menos grave	2004
c.1369del	exon9		muy grave	2007
c.1370C>T	exon9	p.Pro457Leu	potencialmente leves	2008
c.1371delC	exon9	p.Tyr458ThrfsX19	muy grave	2008
c.1373_1375del	exon9	p.Asp459del	muy grave	2004
c.1374C>T	exon9	p.Tyr458Tyr	no patógenos	1993
c.1375G>A	exon9	p.Asp459Asn	desconocido	2008
c.1381G>A	exon9	p.Gly461Ser	potencialmente me- nos graves	2008
c.1396delG	exon9	p.Val466fsX11	muy grave	2008
c.1396G>T	exon9	p.Val466Phe	potencialmente me- nos graves	2008
c.1397T>G	exon9	p.Val466Gly	desconocido	2006
c.1408_1410del	exon9	p.Asn470del	desconocido	2002
c.1411_1414del	exon9	p.Glu471fsX5	muy grave	1996
c.1432G>A	exon9	p.Gly478Arg	potencialmente me- nos graves	1995
c.1437G>C	exon9	p.Lys479Asn	potencialmente me- nos graves	2008
c.1437G>A	exon9	r.spl	menos grave	2008
c.1437+2T>C	intron9	p.Asp443_Lys479del	muy grave	2001
c.1437+4G>C	intron9	No codificante	no patógenos	2008
c.1438-19C>G	intron9	No codificante	no patógenos	1995
c.1438-1G>C	intron9	r.spl	muy grave	2001
c.1438-1G>T	intron9	r.0?	muy grave	2008
c.1441del	exon10	p.Trp481fsX39	muy grave	1998
c.1441T>C	exon10	p.Trp481Arg	potencialmente me- nos graves	1998
c.1445C>T	exon10	p.Pro482Leu	desconocido	2007
c.1445C>G	exon10	p.Pro482Arg	potencialmente me- nos graves	2008
c.1447G>A	exon10	p.Gly483Arg	potencialmente me- nos graves	2008
c.1448G>T	exon10	p.Gly483Val	potencialmente me- nos graves	2008
c.1456G>C	exon10	p.Ala486Pro	desconocido	2009
c.1456_1468del	exon10	p.Ala486fsX30	muy grave	1994
c.1460T>C	exon10	p.Phe487Ser	potencialmente me- nos graves	2008
c.1465G>A	exon10	p.Asp489Asn	potencialmente me- nos graves	2006
c.1495T>A	exon10	p.Trp499Arg	potencialmente me- nos graves	2008
c.1496G>A	exon10	p.Trp499X	muy grave	2008
c.1497G>A	exon10	p.Trp499X	muy grave	2000
c.1509_1511del	exon10	p.Ala504del	potencialmente me- nos graves	2008
c.1540G>C	exon10	p.Gly514Arg	menos graves	2007
c.1548G>A	exon10	p.Trp516X	muy grave	2004

c.1551+1G>C	intron10	p.Val480_Ile517del	muy grave	1994
c.1551+42G>A	intron10	No involucrado	no patógenos	2008
c.1551+49A>C	intron10	No involucrado	no patógenos	2008
c.1551+49A>T	intron10	No involucrado	no patógenos	2008
c.1552-3C>G	intron10	leaky splice	potencialmente leves	2006
c.1555A>G	exon11	p.Met519Val	menos grave	1994
c.1556T>C	exon11	p.Met519Thr	potencialmente me- nos graves	1995
c.1561G>C	exon11	p.Glu521Gln	desconocido	2008
c.1561G>A	exon11	p.Glu521Lys	potencialmente me- nos graves	1991
c.1564C>G	exon11	p.Pro522Ala	potencialmente me- nos graves	2007
c.1564C>A	exon11	p.Pro522Thr	desconocido	2007
c.1564C>T	exon11	p.Pro522Ser	desconocido	2008
c.1574T>A	exon11	p.Phe525Tyr	desconocido	2010
c.1581A>G	exon11	p.Arg527Arg	no patógenos	1990
c.1585_1586TC>GT	exon11	p.Ser529Val	potencialmente leves	1996
c.1626C>G	exon11	r.spl?	desconocido	2006
c.1634C>T	exon11	p.Pro545Leu	menos grave	1994
c.1636+1G>C	intron11	r.0?	muy grave	2008
c.1636+5G>T	intron11	r.spl	potencialmente leves	2008
c.1636+5G>C	intron11	p.Gly546_Val547ins 145X146	muy grave	2008
c.1642G>T	exon12	p.Val548Phe	desconocido	2008
c.1645G>A	exon12	p.Gly549Arg	potencialmente leves	2004
c.1645G>C	exon12	p.Gly549Arg	potencialmente leves	2006
c.1655T>C	exon12	p.Leu552Pro	potencialmente me- nos graves	2001
c.1673G>C	exon12	p.Cys558Ser	desconocido	
c.1669A>T	exon12	p.Ile557Phe	desconocido	2010
c.1687C>T	exon12	p.Gln563X	muy grave	2001
c.1696T>C	exon12	p.Ser566Pro	potencialmente me- nos graves	1995
c.1710C>G	exon12	p.Asn570Lys	potencialmente me- nos graves	2008
c.1716C>G	exon12	p.His572Gln	desconocido	2008
c.1717A>C	exon12	p.Asn573His	potencialmente me- nos graves	2008
c.1724A>C	exon12	p.Tyr575Ser	potencialmente me- nos graves	2004
c.1725C>A	exon12	p.Tyr575X	muy grave	2009
c.1726G>A	exon12	p.Gly576Ser	presumiblemente no patógenos	1995
c.1727G>A	exon12	p.Gly576Asp	potencialmente me- nos graves	2008
c.1735G>A	exon12	p.Glu579Lys	potencialmente me- nos graves	2004

c.1748C>T	exon12	p.Ser583Phe	potencialmente menos graves	2008
c.1754G>T	exon12	p.Arg585Met	potencialmente menos graves	2000
c.1754G>A	exon12	p.Arg585Lys	desconocido	2008
c.1754+12A>G	intron12	No involucrado	no patógenos	2008
c.1754+16C>T	intron12	No codificante	no patógenos	2008
c.1755-1G>A	intron12	r.0?	muy grave	2006
c.1776del	exon13	p.Thr593HisfsX5	muy grave	2006
c.1781G>C	exon13	p.Arg594Pro	potencialmente menos graves	2008
c.1796C>A	exon13	p.Ser599Tyr	potencialmente menos graves	2008
c.1798C>T	exon13	p.Arg600Cys	menos grave	2000
c.1799G>A	exon13	p.Arg600His	potencialmente menos graves	1999
c.1799G>T	exon13	p.Arg600Leu	potencialmente menos graves	2007
c.1802C>G	exon13	p.Ser601Trp	potencialmente menos graves	2006
c.1819_1836del	exon13	p.Gly607_His612del	muy grave	2000
c.1820G>A	exon13	p.Gly607Asp	potencialmente menos graves	2004
c.1822C>T	exon13	p.Arg608X	muy grave	2008
c.1826dup	exon13	p.Tyr609X	muy grave	2004
c.1827del	exon13	p.Tyr609X	muy grave	2004
c.1829C>T	exon13	p.Ala610Val	menos grave	2007
c.1830C>T	exon13	p.Ala610Ala	no patógenos	2004
[ c.1833_1839del; c.1846G>T; c.1847_1848insT]	exon13	pHis612_Asp616del insArgGlyIle	muy grave	2006
c.1834C>T	exon13	p.His612Tyr	desconocido	2009
c.1836C>G	exon13	p.His612Gln	potencialmente menos graves	2006
c.1841C>A	exon13	p.Thr614Lys	potencialmente menos graves	2008
c.1843G>A	exon13	p.Gly615Arg	potencialmente menos graves	1999
c.1850T>C	exon13	p.Val617Ala	no patógenos	2008
c.1856G>A	exon13	p.Ser619Asn	menos grave	2006
c.1857C>G	exon13	p.Ser619Arg	menos grave	2003
c.1872C>T	exon13	p.=(Leu624)	no patógenos	2008
c.1880C>T	exon13	p.Ser627Phe	desconocido	2008
c.1888+1G>A	intron13	r.0?	muy grave	2008
c.1888+21G>A	intron13	No involucrado	no patógenos	2008
c.1912G>T	exon14	p.Gly638Trp	potencialmente menos graves	1998
c.1905C>A	exon14	p.Asn635Lys	desconocido	2009

c.1913G>T	exon14	p.Gly638Val	potencialmente me- nos graves	2004
c.1917G>A	exon14	p.Val639Val	no patógenos	1995
c.1920T>G	exon14	p.Pro640Pro	no patógenos	2008
c.1927G>A	exon14	p.Gly643Arg	potencialmente me- nos graves	1993
c.1929_1935dup	exon14	pVal84fsX94	muy grave	2009
c.1930G>C	exon14	p.Ala644Pro	desconocido	2007
c.1933G>C	exon14	p.Asp645His	potencialmente me- nos graves	1995
c.1933G>A	exon14	p.Asp645Asn	potencialmente me- nos graves	1998
c.1933G>T	exon14	p.Asp645Tyr	potencialmente me- nos graves	2007
c.1935C>A	exon14	p.Asp645Glu	potencialmente me- nos graves	1993
c.1941C>G	exon14	p.Cys647Trp	potencialmente me- nos graves	1994
c.1942G>A	exon14	p.Gly648Ser	potencialmente me- nos graves	1998
c.1960T>C	exon14	p.Ser654Pro	potencialmente me- nos graves	2008
c.1962_1964del	exon14	p.Glu655del	muy grave	2008
c.1971G>A	exon14	p.=(Leu657)	no patógenos	2008
c.1978C>T	exon14	p.Arg660Cys	desconocido	2006
c.1979G>A	exon14	p.Arg660His	potencialmente me- nos graves	2003
c.1981T>G	exon14	p.Trp661Gly	potencialmente me- nos graves	2008
c.2012T>G	exon14	p.Met671Arg	potencialmente me- nos graves	2006
c.2014C>T	exon14	p.Arg672Trp	menos grave	1998
c.2015G>A	exon14	p.Arg672Gln	menos grave	1998
c.2024_2026del	exon14	p.Asn675del	potencialmente me- nos graves	1999
c.2040G>A	exon14	r.spl?	desconocido	2007
c.2040+12G>A	intron14	No involucrado	no patógenos	2008
c.2040+20G>A	intron14	No involucrado	no patógenos	2008
c.2040+20G>T	intron14	No involucrado	no patógenos	2008
c.2040+22G>T	intron14	No involucrado	no patógenos	2008
c.2041-64A>G	intron14	No codificante	no patógenos	2002
c.2041-2A>C	intron14	p.Pro681_Asp682de l	muy grave	2004
c.2041-1G>A	intron14	r.0?	muy grave	2008
c.2055C>A	exon15	p.Tyr685X	muy grave	2007
c.2061C>T	exon15	p.Phe687Phe	no patógenos	2008
c.2065G>A	exon15	p.Glu689Lys	no patógenos	1994
c.2066_2070dup	exon15	p.Ala691fsX6	muy grave	2006

c.2104C>T	exon15	p.Arg702Cys	potencialmente me- nos graves	2004
c.2105G>A	exon15	p.Arg702His	potencialmente leves	2008
c.2132C>G	exon15	p.Thr711Arg	desconocido	2007
c.2133A>G	exon15	p.Thr711Thr	no patógenos	1993
c.2135T>C	exon15	p.Leu712Pro	menos grave	2008
c.2140del	exon15	p.His714fs	muy grave	2007
c.2154C>T	exon15	p.Val718Val	no patógenos	1998
c.2161dupG	exon15	p.Glu721GlyfsX16	muy grave	2008
	exon15	p.Val723Met	desconocido	2007
c.2173C>T	exon15	p.Arg725Trp	menos grave	1993
c.2174G>C	exon15	p.Arg725Pro	potencialmente me- nos graves	2008
c.2185delC	exon15	p.Thr729fsX8	muy grave	2009
c.2188G>T	exon15	p.Glu730X	muy grave	2003
c.2189+1G>A	intron15	r.0?	muy grave	2008
c.2189+459_3405del	intron15	p.Glu730_Cys952del	muy grave	1999
c.2190-53C>G	intron15	No codificante	no patógenos	2008
c.2210C>A	exon16	p.Thr737Asn	potencialmente me- nos graves	2008
c.2219_2220delTG	exon16	p.Val740GfsX55	muy grave	2006
c.2227C>T	exon16	p.Gln743X	muy grave	2008
c.2228A>G	exon16	p.Gln743Arg	potencialmente me- nos graves	2008
c.2236T>G	exon16	p.Trp746Gly	desconocido	2010
c.2237G>C	exon16	p.Trp746Ser	potencialmente me- nos graves	2008
c.2237G>A	exon16	p.Trp746X	muy grave	1998
c.2238G>C	exon16	p.Trp746Cys	menos grave	1994
c.2238G>A	exon16	p.Trp746X	muy grave	2006
c.2242dup	exon16	p.Glu748fsX48	muy grave	1998
c.2255_2257del	exon16	p.Ile752del	desconocido	2007
c.2269C>T	exon16	p.Gln757X	muy grave	2007
c.2281delGinsAT	exon16	p.Ala761fs	muy grave	2006
c.2300delT	exon16	p.Phe767SerfsX14	muy grave	2008
c.2303C>G	exon16	p.Pro768Arg	potencialmente me- nos graves	1995
c.2314T>C	exon16	p.Trp772Arg	potencialmente me- nos graves	2008
c.2326C>T	exon16	p.Gln776X	muy grave	2008
c.2331+2T>C	intron16	p.Tyr773fsX3	muy grave	1997
c.2331+2T>A	intron16	Error de splicing	muy grave	2008
c.2331+4A>G	intron16	Error de splicing	menos grave	2006
c.2331+20A>G	intron16	No involucrado	no patógenos	2007
c.2331+24C>T	intron16	No involucrado	no patógenos	2008
c.2338A>G	exon17	p.Ile780Val	no patógenos	1990
c.2357dupT	exon17	p.Pro788ThrfsX8	muy grave	2008
c.2380del	exon17	p.Arg794fsX12	muy grave	1999

c.2373_2376del insTGCTCA	exon17	p.Pro793HisfsX14	muy grave	2010
c.2431dup	exón 17	p.Leu811fsX73	muy grave	1998
c.2432delT	exon17	p.Leu811fsX36	muy grave	2006
c.2446G>A	exon17	p.Val816Ile	no patógenos	1993
c.2481+102_2646 +31del	intron17	p.Gly828_Asn882del	muy grave	1994
c.2501_2502del	exon18	p.Thr834ArgfsX49	muy grave	2008
c.2530_2541del	exon18	p.Arg844_Leu847del	potencialmente me- nos graves	2008
c.2553A>G	exon18	p.Gly851Gly	no patógenos	1990
c.2560C>T	exon18	p.Arg854X	muy grave	1993
c.2600_2604delinsA	exon18	p.Glu867fs	muy grave	2007
c.2604delG	exon18	p.Leu868fs	muy grave	2007
c.2608C>T	exon18	p.Arg870X	muy grave	2006
c.2639C>A	exon18	p.Ala880Asp	potencialmente me- nos graves	2004
c.2646_2646+1delTG	exon18	r.0?	muy grave	2006
c.2646+2T>A	intron18	p.Val876_Asn882del	muy grave	2002
c.2662G>T	exon19	p.Glu888X	muy grave	2006
c.2702T>A	exon19	p.Leu901Gln	potencialmente me- nos graves	2004
c.2707_2709del	exon19	p.Lys903del	muy grave	1995
c.2724C>G	exon19	p.Gly908Gly	no patógenos	2008
c.2740dup; c.2742dup	exon19	p.Gln914fsX30	muy grave	1995
c.2758_2775dup	exon19	p.Gly920_Asn925dup	muy grave	1998
c.2770T>C	exon19	p.Ser924Pro	no patógenos	2006
c.2780C>T	exon19	p.Thr927Ile	no patógenos	1993
c.2800-60A>G	intron19	No involucrado	no patógenos	2008
c.2800-4T>G	intron19		desconocido	2007
c.2804T>C	exon20	p.Leu935Pro	desconocido	2008
c.2808C>T	exon20	p.Asp936Asp	no patógenos	1995
c.2815_2816del	exon20	p.Val939fsX78	muy grave	1999
c.2842insT	exon20	p.Leu948SerfsX70	muy grave	2010
c.2846T>A	exon20	p.Val949Asp	potencialmente me- nos graves	1998
c.2859G>A(*3)	exon20	3' no codificante	no patógenos	1993
c.*16T>A	exon20	3' no codificante	no patógenos	2008
c.*91G>A	exon20	3' no codificante	no patógenos	2003
c.*140del	exon20	3' no codificante	no patógenos	1990
c.*143C>T	exon20	3' no codificante	no patógenos	1990
c.*154insG	exon20	3' no codificante	no patógenos	2008
c.*223C>T	exon20	3' no codificante	no patógenos	1990
c.*227G>C	exon20	3' no codificante	no patógenos	1990
c.*418T>C	exon20	3' no codificante	no patógenos	1990

**ANEXO III****RECOGIDA DE DATOS DE PACIENTES DIAGNOSTICADOS DE ENFERMEDAD DE POMPE****· IDENTIFICACIÓN DEL PACIENTE**

Nombre y Apellidos (o Iniciales):

Fecha de Nacimiento y Edad:

Sexo:

**· SÍGNOS Y SÍNTOMAS PREVIOS AL DIAGNÓSTICO****SÍNTOMAS MUSCULARES**

Debilidad muscular:

SI NO

Hipotonía:

Problemas para caminar o subir escaleras:

Uso de silla de ruedas:

Otros signos/síntomas musculares (indicar cuál/es):

**SIGNOS ESQUELÉTICOS**

Lordosis:

Cifosis:

Escoliosis:

Escápula alata:

Otros signos/síntomas esqueléticos (indicar cuál/es):

**SIGNOS CARDIACOS**

Cardiopatía hipertrófica:

Insuficiencia cardiaca:

Otros signos/síntomas cardiacos (indicar cuál/es):

**SÍNTOMAS RESPIRATORIOS**

Alteraciones respiratorias del sueño:

Insuficiencia respiratoria:

Necesidad de ventilación artificial:

Otros signos/síntomas respiratorios (indicar cuál/es):

**SÍNTOMAS/SIGNOS NEUROLÓGICOS**

Afectación de los reflejos:

Dolor:

Epilepsia:

Otros signos/síntomas neurológicos (indicar cuál/es):

**OTROS SIGNOS/SÍNTOMAS**

Fatiga:

HiperCKemia:

Hiperglosia:

Problemas de alimentación:

Hepato/Esplenomegalia:

Otros signos/síntomas destacables (indicar cuál/es):

▪ **TRAS EL DIAGNÓSTICO**

**Indicar edad del paciente al diagnosticar la enfermedad:**

**Se ha realizado estudio molecular** SI NO  
   
**En caso afirmativo indicar mutación/es y si se encuentran en**  
**homo/heterocigosis:**

**Existen antecedentes familiares:**    
**En caso afirmativo indicar grado de parentesco:**

**Se ha iniciado Tratamiento de Sustitución Enzimática**    
**En caso afirmativo indicar fecha de inicio del tratamiento:**  
**En caso afirmativo indicar edad del paciente al inicio del tratamiento:**

**Han aparecido nuevos signos/síntomas tras el diagnóstico y tratamiento:**    
**En caso afirmativo indicar cuáles:**

**Existen hitos destacables tras el inicio del tratamiento:**    
**En caso afirmativo indicar cuáles:**

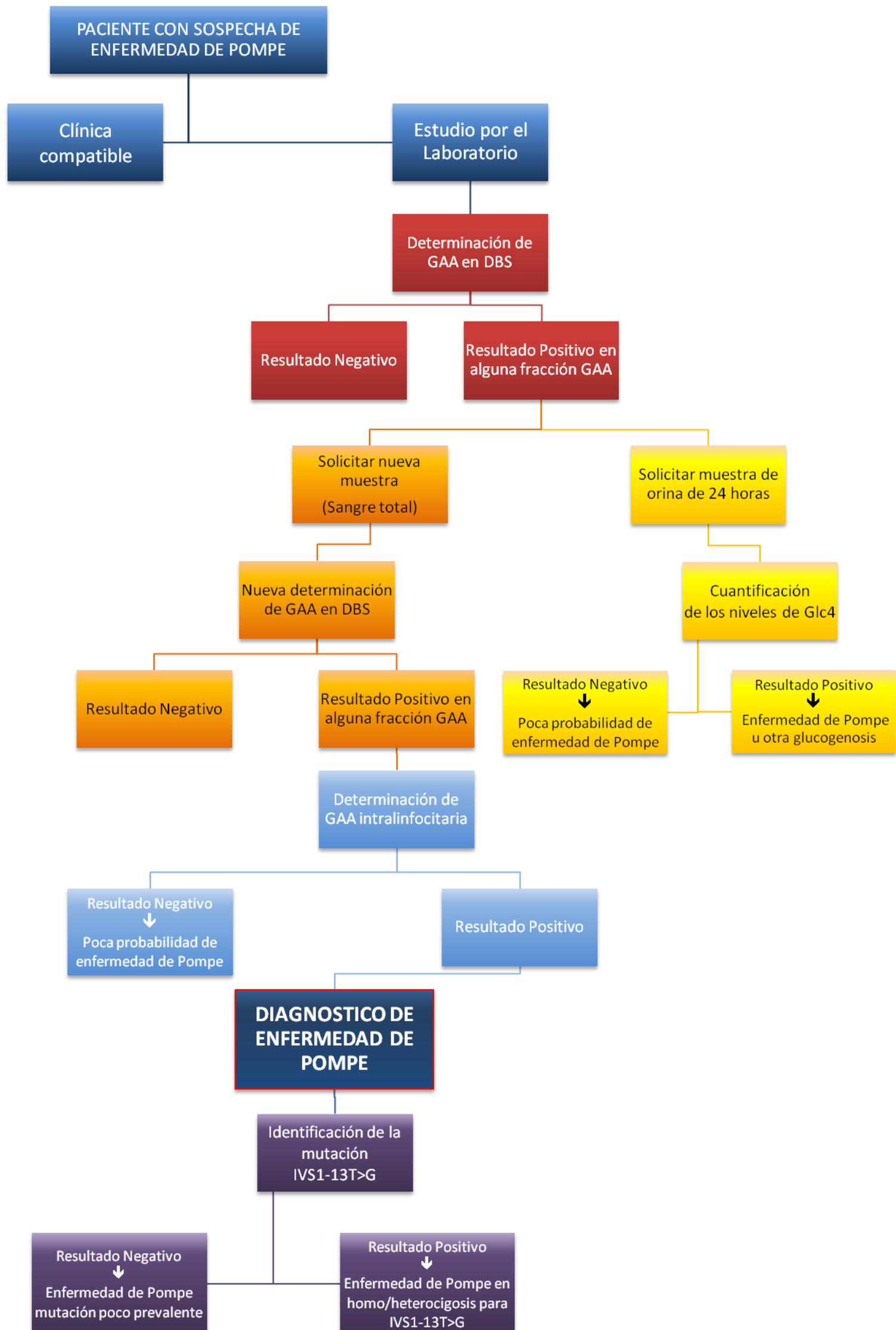
**INDICAR OTRAS CUESTIONES QUE CONSIDERE DE IMPORTANCIA:**

**Nombre/Apellidos/Especialidad del facultativo responsable del diagnóstico/tratamiento/seguimiento del paciente:**

**Hospital en el que el paciente ha sido diagnosticado y está siendo seguido/tratado el paciente:**

**ANEXO IV**

## ALGORITMO DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD DE POMPE PARA EL LABORATORIO CLÍNICO





## ANEXO V

### **Joannes Casiano de Pompe el Hombre tras el Doctor**

Para terminar esta Tesis, me ha parecido realmente importante, hacer referencia al hombre que se encuentra tras la descripción de la enfermedad que lleva su nombre; no ya en su faceta médica y científica, muy reconocida y valorada, sino en su parte más humana, pues se trata de un hombre que no sólo se convirtió en doctor, sino también en héroe.

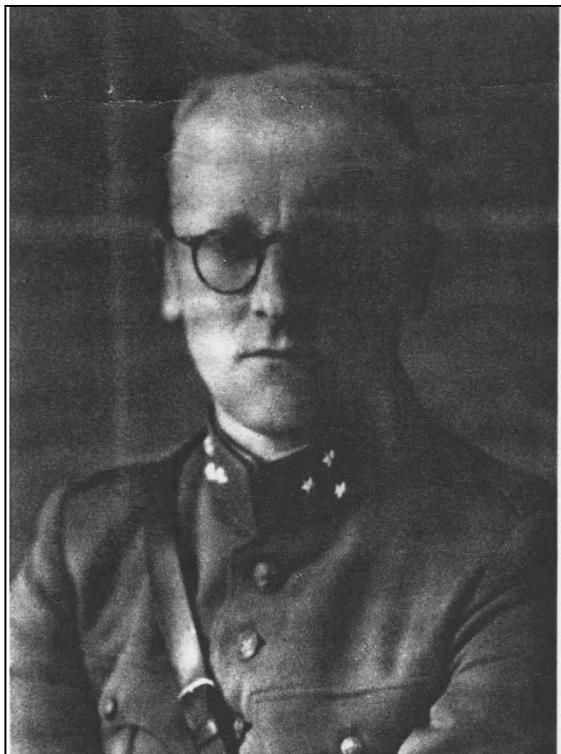
J. C. Pompe alcanzó el título de doctor en 1936 con la tesis titulada “Cardiomegalia glucogénica”, basada en su primer caso donde describió la enfermedad. Puede apreciarse, por tanto, que éste había sido un tema de permanente estudio para él.

Después de una temporada en el Hospital San Canisio, en Nimega, fue nombrado patólogo en el Hospital de Nuestra Señora en Ámsterdam, donde trabajó desde junio de 1939 hasta su muerte.

Su lugar de trabajo era muy adecuado para él, ya que era un conocido católico, muy devoto, y con un gran amor y dedicación a su familia. Era a su vez un gran admirador de Sófocles y del poeta holandés Vondel. Podríamos decir de él, que era lo que se conoce como un "hombre renacentista": un hombre de ciencia y de artes. Además, sin duda guiado por sus fuertes creencias cristianas, se convirtió durante la II Guerra Mundial, en un miembro muy activo de la resistencia holandesa.



Joannes Cassianus Pompe nació en Utrecht el 9 de septiembre de 1901. Estudió medicina en la Universidad de Utrecht, y durante este tiempo se topó con los síntomas de lo que ahora se conoce como enfermedad de Pompe, que él describió en su publicación de 1932, “Concerning idiopathic hypertrophy of the heart”.



Dr. Pompe con su uniforme de capitán del ejército holandés (Médico de Reserva), se cree que fue tomada entre 1939 y 1940. A raíz de la invasión nazi de los Países Bajos el 10 de mayo de 1940, fue movilizado y participó en los combates, que duraron hasta el 15 de mayo del mismo año.

Después de la caída de los Países Bajos, el Dr. Pompe se incorporó, como indicamos, a la resistencia holandesa. En un primer momento se vio involucrado en la búsqueda de escondites para los judíos. Realizando esta tarea se puso en contacto con el operador de un transmisor ilegal que pasaba información importante a las fuerzas de los países aliados, principalmente al Reino Unido.

El laboratorio de Pompe, aislado del resto del hospital, se convirtió en el escondite ideal tanto para ocultar a los judíos perseguidos como para el transmisor, convirtiéndose así, en uno de los principales centros de operaciones de la resistencia holandesa (noviembre-diciembre de 1944).

A pesar de todas las precauciones, el transmisor fue descubierto por los alemanes, y el domingo 25 de febrero de 1945, a las 10 horas, entre 40 y 50 miembros de la Policía Militar alemana irrumpieron en el hospital y se dirigieron directamente al laboratorio. El operador del transmisor, Pierre Antoine Coronel, estaba transmitiendo en ese mismo momento y trató de resistir sin éxito; lo capturaron y fue ejecutado en el patio del hospital junto con los judíos refugiados y varios miembros del hospital. Tras la guerra, una calle de Amsterdam lleva su nombre: Coronel Street.

Durante la redada, el Dr. Pompe se encontraba en la misa dominical y al volver al hospital fue advertido por los pacientes de lo que había ocurrido. Volvió a su casa a decir a su esposa que tendrían que pasar a la clandestinidad. Al salir de su domicilio fue detenido en presencia de su esposa y sus hijos, que fueron cruelmente amenazados.

Mientras que algunos de los encarcelados fueron puestos en libertad, el Dr. Pompe, Louis Berben (ayudante de laboratorio) y un enfermero, Piet van Doorn, fueron retenidos en la cárcel.

El 14 de abril de 1945, la resistencia voló un puente ferroviario cerca de St Pancras, el propio tren militar resultó destruido en el ataque. Como represalia, 20 presos holandeses, entre ellos el Dr. Pompe y Louis Berben, fueron llevados en un camión a un prado cerca de St Pancras y, en torno a las 9 de la noche el 15 de abril, fueron fusilados. Los cuerpos fueron enterrados en una fosa común cerca de Overveen. El mismo día, Piet van Doorn, también fue ejecutado, en represalia por otro ataque a un tren alemán<sup>45</sup>.

Después de la guerra se erigió un monumento a las víctimas...

***Sólo me satisface aquella ciencia  
que ha sabido hacer virtuosos  
a quienes la profesaron.***

Salustio (83 AC-35 AC)

Caius Sallustius Crispus.

Historiador latino.



# **BIBLIOGRAFIA**



## BIBLIOGRAFÍA

1. Birnbaum ZW, Sirken MG. *Design of sample surveys to estimate the prevalence of rare diseases: three unbiased estimates*. Vital Health Stat 2. 1965; (11):1-8.
2. Decision N° 1295/1999/EC de la European Parliament and of the Council del 29 de April del 1999 adopting a programme of Community action on rare diseases within the framework for action in the field of public health (1999 a 2003). Disponible en: [http://europa.eu.int/eur-lex/pri/en/oj/dat/1999/l\\_155/l\\_15519990622en00010005.pdf](http://europa.eu.int/eur-lex/pri/en/oj/dat/1999/l_155/l_15519990622en00010005.pdf)
3. Comunicación de la Comisión Europea de Dirección General de Sanidad y Protección de los Consumidores al Parlamento Europeo, al Consejo, al Comité Económico y Social Europeo y al Comité de las Regiones. *Las Enfermedades Raras: Un reto para Europa*. Bruselas, 11/11/2008. Disponible en: [http://ec.europa.eu/health/ph\\_threats/non\\_com/docs/rare\\_com\\_es.pdf](http://ec.europa.eu/health/ph_threats/non_com/docs/rare_com_es.pdf)
4. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, “The Orphan Drug Act”, EEUU. Disponible en: <http://www.fda.gov/orphan/oda.htm>
5. The Organization for Pharmaceutical Safety and Research, “Orphan Drug Regulation”, Japón. Disponible en: <http://www.kiko.gov.jp>
6. Department of Health and Aged Care (2001) “The Orphan Drug Program and improving community access to effective drugs for rare diseases”, Australia. Disponible en: <http://www.tga.health.gov.au/docs/pdf/orphrev.pdf>
7. Palau F. Enfermedades raras, *Un paradigma emergente en la medicina del siglo XXI*. Med Clin 2010; 134 (4):161-8
8. Posada De la Paz M, Martín-Arribas C, Ramírez A, Villaverde A, Abitua I. *Enfermedades raras. Concepto, epidemiología y situación actual en España*. An Sist Sanit Navar 2008; 31(2):9-20.
9. Pampols Ros T, Benedetto Terracini B, de Abajo Iglesias FJ, Feito Grande L, Martín Arribas MC, Fernández Soria JM, et al. *Recomendaciones sobre los aspectos éticos de los programas de cribado de población para enfermedades raras*. Rev Esp Salud Pública 2010; 84(2):121-36.

10. Guillén Enriquez J, Durán Plá E, Pastor Gracia MA, Rodríguez Romero E. *Aproximación a la Situación de las Enfermedades Raras en Andalucía*. Consejería de Salud y REPIER. 2004.
11. Zurriaga Lloréns O, Martínez García C, Arizo Luque V, Sánchez Pérez MJ, Ramos Aceitero JM, García Blasco MJ, et al. *Los Registros de Enfermedades en la Investigación Epidemiológica de las Enfermedades Raras en España*. Rev Esp Salud Pública 2005; 80(3):249-57.
12. Izquierdo Martínez M, Avellaneda Fernández A. *Enfermedades Raras: un enfoque práctico*. Madrid: Instituto de Salud Carlos III, 2004. Disponible en: [http://bvs.isciii.es/mono/pdf/IIER\\_01.pdf](http://bvs.isciii.es/mono/pdf/IIER_01.pdf)
13. *Plan de Atención a Personas afectadas por Enfermedades Raras 2008-2012. Junta de Andalucía*. Consejería de Salud. 2007. Disponible en: <http://www.juntadeandalucia.es/servicioandaluzdesalud/contenidos/gestioncalidad/PlanAndaluzEnfermedadesRaras2088-2012.pdf>
14. Posada de la Paz M. *Las enfermedades raras y su impacto en la gestión de los servicios de salud*. Rev Adm Sanit 2008; 6:157-78.
15. Izquierdo Martínez M, Avellaneda Fernández A. *Enfoque interdisciplinario de las enfermedades raras: un nuevo reto para un nuevo siglo*. Med Clin 2003; 121(8):299-303.
16. Fontana D, Uema S, Mazzieri MR. **Medicamentos Huérfanos: Una Revisión Necesaria Para Un Problema Sanitario No Resuelto**. Acta Farm Bonaerense 2005; 24(1):123-9.
17. Meikle PJ, Hopwood JJ, Clague AE, Carey WF. *Prevalence of lysosomal storage disorders*. JAMA 1999; 281(3):249-54.
18. Marsden D, Levy H. *Newborn screening of lysosomal storage disorders*. Clin Chem 2010; 56(7):1071-9.
19. Vellodi A. *Lysosomal storage disorders*. Br J Haematol. 2005; 128(4):413-31.
20. Parkinson-Lawrence EJ, Shandala T, Prodoehl M, Plew R, Borlace GN, Brooks DA. *Lysosomal storage disease: revealing lysosomal function and physiology*. Physiology (Bethesda). 2010; 25(2):102-15.
21. Reuser AJ, Drost MR. *Lysosomal dysfunction, cellular pathology and clinical symptoms: basic principles*. Acta Paediatr Suppl 2006; 95(451):77-82.

22. Reismann P, Tulassay Z. *Treatment prospects of lysosomal storage disorders*. Orv Hetil 2008; 149(25):1171-9.
23. De Duve C, Pressman Bc, Gianetto R, Wattiaux R, Appelmans F. *Tissue fractionation studies. 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue*. Biochem J 1955; 60(4):604-17.
24. Hers HG. *Alpha-glucosidase deficiency in generalized glycogen storage disease (Pompe's disease)*. Biochem J 1963; 86:11-6.
25. Hers HG. *Inborn lysosomal diseases*. Gastroenterology 1965; 48:625-33.
26. Hers HG. *Studies on glycogen and glycogenesis*. Verh K Vlaam Acad Geneeskd Belg 1966; 28(3):369-79.
27. Huotari J, Helenius A. *Endosome maturation*. EMBO J 2011; 30(17):3481-500.
28. Luzio JP, Pryor PR, Bright NA. *Lysosomes: fusion and function*. Nat Rev Mol Cell Biol 2007; 8(8):622-32.
29. Luzio JP, Poupon V, Lindsay MR, Mullock BM, Piper RC, Pryor PR. *Membrane dynamics and the biogenesis of lysosomes*. Mol Membr Biol 2003; 20(2):141-54.
30. Lüllmann R. *History and morphology of the lysosome*. Saftig P, editor. Lysosomes. New York: Springer Science, Landes Bioscience; 2005. p. 1–16.
31. Reuser AJ, Drost MR. *Lysosomal dysfunction, cellular pathology and clinical symptoms: basic principles*. Acta Paediatr Suppl 2006; 95(451):77-82.
32. Walkley SU. *Pathogenic cascades in lysosomal disease - Why so complex?* J Inherit Metab Dis 2009; 32(2):181-9.
33. Kloska A, Tylki-Szymańska A, Wegrzyn G. *Lysosomal storage diseases - an overview*. Postepy Biochem. 2011; 57(2):128-32.
34. Wilcox WR. *Lysosomal storage disorders: the need for better pediatric recognition and comprehensive care*. J Pediatr 2004; 144(5):3-14.
35. Maire I. *Lysosomal storage diseases: functional classification and treatment principles*. Presse Med 2007; 36 Spec N° 1(1):S88-95.
36. Mundy H, Lee PJ. *The glycogen storage diseases*. Current Paediatrics 2004; 14(5):407-13.

37. Akman HO, Raghavan A, Craigen WJ. *Animal models of glycogen storage disorders*. Prog Mol Biol Transl Sci 2011; 100:369-88.
38. Ozen H. *Glycogen storage diseases: new perspectives*. World J Gastroenterol 2007; 13(18):2541-53.
39. Mayatepek E, Hoffmann B, Meissner T. *Inborn errors of carbohydrate metabolism*. Best Pract Res Clin Gastroenterol 2010; 24(5):607-18.
40. Macleod JJR, Aberd MB. *The control of carbohydrate metabolism*. Lancet 1932; 219(5673):1079-86.
41. Cori GT, Cori CF. *Glucose-6-phosphatase of the liver in glycogen storage disease*. J Biol Chem 1952; 199(2):661-7.
42. de Barsey T, Hers HG. *Normal metabolism and disorders of carbohydrate metabolism*. Baillieres Clin Endocrinol Metab 1990; 4(3):499-522.
43. Chien YH, Hwu WL. *A review of treatment of Pompe disease in infants*. Biologics 2007; 1(3):195-201.
44. Pompe JC. *Concerning idiopathic hypertrophy of the heart*. Ned Tijdschr Geneesk. 1932; 76:304-11.
45. Netherlands Institute for War Documentation. Disponible en: <http://www.niod.nl/>
46. Filocamo M, Morrone A. *Lysosomal storage disorders: molecular basis and laboratory testing*. Hum Genomics 2011; 5(3):156-69.
47. Cox TM, Cachón González MB. *The Cellular Pathology of Lysosomal Diseases*. J Pathol 2012; 226(2):241-54.
48. Ballabio A, Gieselmann V. *Lysosomal disorders: from storage to cellular damage*. Biochim Biophys Acta 2009; 1793(4):684-96.
49. Walkley SU. *Pathogenic mechanisms in lysosomal disease: a reappraisal of the role of the lysosome*. Acta Paediatr Suppl 2007; 96(455):26-32.
50. Winchester B, Vellodi A, Young E. *The molecular basis of lysosomal storage diseases and their treatment*. Biochem Soc Trans 2000; 28(2):150-4.
51. Engel AG, Gomez MR, Seybold ME, Lambert EH. *The spectrum and diagnosis of acid maltase deficiency*. Neurology 1973; 23(1):95-106.

52. Di Rocco M, Buzzi D, Tarò M. *Glycogen storage disease type II: clinical overview*. Acta Myol 2007; 26(1):42-4.
53. van den Hout HM, Hop W, van Diggelen OP, Smeitink JA, Smit GP, Poll-The BT, et al. *The natural course of infantile Pompe's disease: 20 original cases compared with 133 cases from the literature*. Pediatrics 2003; 112(2):332-40.
54. Kishnani PS, Hwu WL, Mandel H, Nicolino M, Yong F, Corzo D. *A retrospective, multinational, multicenter study on the natural history of infantile-onset Pompe disease*. J Pediatr 2006; 148(5):671-676.
55. Slonim AE, Bulone L, Ritz S, Goldberg T, Chen A, Martiniuk F. *Identification of two subtypes of infantile acid maltase deficiency*. J Pediatr 2000; 137(2):283-5.
56. Schoser BG, Müller-Höcker J, Horvath R, Gempel K, Pongratz D, Lochmüller H, et al. *Adult-onset glycogen storage disease type 2: clinico-pathological phenotype revisited*. Neuropathol Appl Neurobiol 2007; 33(5):544-59.
57. Lam CW, Yuen YP, Chan KY, Tong SF, Lai CK, Chow TC, et al. *Juvenile-onset glycogen storage disease type II with novel mutations in acid alpha-glucosidase gene*. Neurology 2003; 60(4):715-7.
58. Desnuelle C, Salviati L. *Challenges in diagnosis and treatment of late-onset Pompe disease*. Curr Opin Neurol 2011; 24(5):443-8.
59. Müller-Felber W, Horvath R, Gempel K, Podskarbi T, Shin Y, Pongratz D, et al. *Late onset Pompe disease: clinical and neurophysiological spectrum of 38 patients including long-term follow-up in 18 patients*. Neuromuscul Disord 2007; 17(9-10):698-706.
60. Hirschhorn, Rochelle and Arnold J. J. Reuser. *Glycogen Storage Disease Type II: Acid Alpha-Glucosidase (Acid Maltase) Deficiency*. In: Scriver C, Beaudet A, Sly W, Valle D, editors. The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease. 8th Edition. New York: McGraw-Hill; 2001; 3389-3420.
61. Ausems MG, Verbiest J, Hermans MP, Kroos MA, Beemer FA, Wokke JH, et al. *Frequency of glycogen storage disease type II in The Netherlands: implications for diagnosis and genetic counselling*. Eur J Hum Genet 1999; 7(6):713-6.
62. Poorthuis BJ, Wevers RA, Kleijer WJ, Groener JE, de Jong JG, van Weely S, et al. *The frequency of lysosomal storage diseases in The Netherlands*. Hum Genet 1999; 105(1-2):151-6.

63. Martiniuk F, Chen A, Mack A, Arvanitopoulos E, Chen Y, Rom WN, et al. *Carrier frequency for glycogen storage disease type II in New York and estimates of affected individuals born with the disease*. Am J Med Genet 1998; 79(1):69-72.
64. Lin CY, Hwang B, Hsiao KJ, Jin YR. *Pompe's disease in Chinese and prenatal diagnosis by determination of alpha-glucosidase activity*. J Inherit Metab Dis 1987; 10(1):11-7.
65. Chien YH, Chiang SC, Zhang XK, Keutzer J, Lee NC, Huang AC, et al. *Early detection of Pompe disease by newborn screening is feasible: results from the Taiwan screening program*. Pediatrics 2008; 122(1):39-45.
66. Meikle PJ, Hopwood JJ, Clague AE, Carey WF. *Prevalence of lysosomal storage disorders*. JAMA 1999; 281(3):249-54.
67. Pinto R, Caseiro C, Lemos M, Lopes L, Fontes A, Ribeiro H, et al. *Prevalence of lysosomal storage diseases in Portugal*. Eur J Hum Genet 2004; 12(2):87-92.
68. Prevalence of rare diseases: Bibliographic data. Informes Periódicos de Orphanet, Enfermedades Raras, Noviembre 2010. Disponible en: [http://www.orpha.net/orphacom/cahiers/docs/ES/Prevalencia\\_de\\_las\\_enfermedades\\_raras\\_por\\_orden\\_alfabetico.pdf](http://www.orpha.net/orphacom/cahiers/docs/ES/Prevalencia_de_las_enfermedades_raras_por_orden_alfabetico.pdf)
69. Shieh JJ, Lin CY. *Frequent mutation in Chinese patients with infantile type of GSD II in Taiwan: evidence for a founder effect*. Hum Mutat 1998; 11(4):306-12.
70. Becker JA, Vlach J, Raben N, Nagaraju K, Adams EM, Hermans MM, et al. *The African origin of the common mutation in African American patients with glycogen-storage disease type II*. Am J Hum Genet 1998; 62(4):991-4.
71. Kuo WL, Hirschhorn R, Huie ML, Hirschhorn K. *Localization and ordering of acid alpha-glucosidase (GAA) and thymidine kinase (TK1) by fluorescence in situ hybridization*. Hum Genet 1996;97(3):404-6
72. Hoefsloot LH, Hoogeveen-Westerveld M, Kroos MA, van Beeumen J, Reuser AJ, Oostra BA. *Primary structure and processing of lysosomal alpha-glucosidase; homology with the intestinal sucrase-isomaltase complex*. EMBO J 1988; 7(6):1697-704.
73. Martiniuk F, Mehler M, Tzall S, Meredith G, Hirschhorn R. *Sequence of the cDNA and 5'-flanking region for human acid alpha-glucosidase, detection of an intron in the 5' untranslated leader sequence, definition of 18-bp polymor-*

- phisms, and differences with previous cDNA and amino acid sequences*. DNA Cell Biol 1990; 9(2):85-94.
74. Hoefsloot LH, Hoogeveen-Westerveld M, Reuser AJ, Oostra BA. *Characterization of the human lysosomal alpha-glucosidase gene*. Biochem J 1990; 272(2):493-7.
  75. Martiniuk F, Bodkin M, Tzall S, Hirschhorn R. *Isolation and partial characterization of the structural gene for human acid alpha glucosidase*. DNA Cell Biol 1991; 10(4):283-92.
  76. Kroos M, Pomponio RJ, van Vliet L, Palmer RE, Phipps M, Van der Helm R, et al. *Update of the Pompe disease mutation database with 107 sequence variants and a format for severity rating*. Hum Mutat 2008; 29(6):E13-26.
  77. Oba-Shinjo SM, da Silva R, Andrade FG, Palmer RE, Pomponio RJ, Ciociola KM, et al. *Pompe disease in a Brazilian series: clinical and molecular analyses with identification of nine new mutations*. J Neurol 2009; 256(11):1881-90.
  78. Byrne BJ, Kishnani PS, Case LE, Merlini L, Müller-Felber W, Prasad S, et al. *Pompe disease: design, methodology, and early findings from the Pompe Registry*. Mol Genet Metab 2011; 103(1):1-11.
  79. Kroos MA, Pomponio RJ, Hagemans ML, Keulemans JL, Phipps M, DeRiso M, et al. *Broad spectrum of Pompe disease in patients with the same c.-32-13T->G haplotype*. Neurology 2007; 68(2):110-5.
  80. Hirschhorn R, Huie ML, Caggana M, Butler J, Pass KA, Hirschhorn JN. *Increased frequency of Pompe disease (infantile glycogen storage disease type II) in Afro-Americans*. Comunicación presentada en Pediatric Academic Societies' Meeting; Mayo del 2004; San Francisco, Calif. Abstract n° 752296. 3395.
  81. Vorgerd M, Burwinkel B, Reichmann H, Malin JP, Kilimann MW. *Adult-onset glycogen storage disease type II: phenotypic and allelic heterogeneity in German patients*. Neurogenetics 1998; 1(3):205-11.
  82. Hirschhorn R, Huie ML. *Frequency of mutations for glycogen storage disease type II in different populations: the Δ525T and Δexon 18 mutations are not generally "common" in white populations*. J Med Genet 1999; 36(1):85-6.
  83. Huie ML, Chen AS, Tsujino S, Shanske S, DiMauro S, Engel AG, Hirschhorn R. *Aberrant splicing in adult onset glycogen storage disease type II (GSDII): mole-*

- cular identification of an IVS1 (-13T→G) mutation in a majority of patients and a novel IVS10 (+1GT→CT) mutation.* Hum Mol Genet 1994;3(12):2231-6
84. Trend PS, Wiles CM, Spencer GT, Morgan-Hughes JA, Lake BD, Patrick AD. *Acid maltase deficiency in adults. Diagnosis and management in five cases.* Brain 1985; 108(4):845-60.
85. Swash M, Schwartz MS, Apps MCP. *Adult onset acid maltase deficiency. Distribution and progression of clinical and pathological abnormality in a family.* J Neurol Sci 1985; 68(1):61-74.
86. Raben N, Nichols RC, Boerkoel C, Plotz P. *Genetic defects in patients with glycogenosis type II (acid maltase deficiency).* Muscle Nerve 1995; 3:S70-4.
87. Montalvo AL, Bembi B, Donnarumma M, Filocamo M, Parenti G, Rossi M, et al. *Mutation profile of the GAA gene in 40 Italian patients with late onset glycogen storage disease type II.* Hum Mutat 2006; 27(10):999-1006.
88. Hermans MM, de Graaff E, Kroos MA, Wisselaar HA, Willemsen R, Oostra BA, et al. *The conservative substitution Asp-645→Glu in lysosomal alpha-glucosidase affects transport and phosphorylation of the enzyme in an adult patient with glycogen-storage disease type II.* Biochem J 1993; 289(3):687-93.
89. Laforêt P, Nicolino M, Eymard PB, Puech JP, Caillaud C, Poenaru L, Fardeau M. *Juvenile and adult-onset acid maltase deficiency in France: genotype-phenotype correlation.* Neurology 2000; 55(8):1122-8.
90. Lin CY, Hwang B, Hsiao KJ, Jin YR. *Study of alpha-D-glucosidase activity in patients with Pompe's disease.* Taiwan Yi Xue Hui Za Zhi 1986; 85(8):766-70.
91. Lin CY, Lee SY, Chang ZN, Su SN, Hwang B, Han SH. *Preparation of monoclonal antibodies against acid alpha-D-glucosidase for study of Chinese glycogenosis type II patients.* Hybridoma 1992; 11(4):493-505.
92. Shieh JJ, Wang LY, Lin CY. *Point mutation in Pompe disease in Chinese.* J Inherit Metab Dis 1994; 17(1):145-8.
93. Lin CY, Shieh JJ. *Molecular study on the infantile form of Pompe disease in Chinese in Taiwan.* Zhonghua Min Guo Xiao Er Ke Yi Xue Hui Za Zhi 1996; 37(2):115-21.

94. Adams EM, Becker JA, Griffith L, Segal A, Plotz PH, Raben N. *Glycogenosis type II: a juvenile-specific mutation with an unusual splicing pattern and a shared mutation in African Americans*. Hum Mutat 1997; 10(2):128-34.
95. Hermans MM, De Graaff E, Kroos MA, Mohkamsing S, Eussen BJ, Joosse M, et al. *The effect of a single base pair deletion (delta T525) and a C1634T missense mutation (pro545leu) on the expression of lysosomal alpha-glucosidase in patients with glycogen storage disease type II*. Hum Mol Genet 1994; 3(12):2213-8.
96. Van der Kraan M, Kroos MA, Joosse M, Bijvoet AG, Verbeet MP, Kleijer WJ, et al. *Deletion of exon 18 is a frequent mutation in glycogen storage disease type II*. Biochem Biophys Res Commun 1994; 203(3):1535-41.
97. Kroos MA, van Leenen D, Verbiest J, Reuser AJ, Hermans MM. *Glycogen storage disease type II: identification of a dinucleotide deletion and a common missense mutation in the lysosomal alpha-glucosidase gene*. Clin Genet 1998; 53(5):379-82.
98. Kroos MA, Van der Kraan M, Van Diggelen OP, Kleijer WJ, Reuser AJ, Van den Boogaard MJ, et al. *Glycogen storage disease type II: frequency of three common mutant alleles and their associated clinical phenotypes studied in 121 patients*. J Med Genet 1995; 32(10):836-7.
99. Jeffrey PL, Brown DH, Brown BI. *Studies of lysosomal alpha-glucosidase. I. Purification and properties of the rat liver enzyme*. Biochemistry 1970; 9(6):1403-15.
100. Jeffrey PL, Brown DH, Brown BI. *Studies of lysosomal alpha-glucosidase. II. Kinetics of action of the rat liver enzyme*. Biochemistry 1970; 9(6):1416-22.
101. Hoefsloot LH, Hoogeveen-Westerveld M, Kroos MA, van Beeumen J, Reuser AJ, Oostra BA. *Primary structure and processing of lysosomal alpha-glucosidase; homology with the intestinal sucrase-isomaltase complex*. EMBO J 1988; 7(6):1697-704.
102. Hoefsloot LH, Willemsen R, Kroos MA, Hoogeveen-Westerveld M, Hermans MM, Van der Ploeg AT, et al. *Expression and routing of human lysosomal alpha-glucosidase in transiently transfected mammalian cells*. Biochem J 1990; 272(2):485-92.
103. Hoefsloot LH, Hoogeveen-Westerveld M, Reuser AJ, Oostra BA. *Characterization of the human lysosomal alpha-glucosidase gene*. Biochem J 1990; 272(2):493-7.

104. Martiniuk F, Mehler M, Tzall S, Meredith G, Hirschhorn R. *Sequence of the cDNA and 5'-flanking region for human acid alpha-glucosidase, detection of an intron in the 5' untranslated leader sequence, definition of 18-bp polymorphisms, and differences with previous cDNA and amino acid sequences*. DNA Cell Biol 1990; 9(2):85-94.
105. Hasilik A, Neufeld EF. *Biosynthesis of lysosomal enzymes in fibroblasts. Phosphorylation of mannose residues*. J Biol Chem 1980; 255(10):4946-50.
106. Reuser AJ, Kroos M, Oude Elferink RP, Tager JM. *Defects in synthesis, phosphorylation, and maturation of acid alpha-glucosidase in glycogenosis type II*. J Biol Chem 1985; 260(14):8336-41.
107. Oude Elferink RP, Van Doorn-Van Wakeren J, Strijland A, Reuser AJ, Tager JM. *Biosynthesis and intracellular transport of alpha-glucosidase and cathepsin D in normal and mutant human fibroblasts*. Eur J Biochem 1985; 153(1):55-63.
108. Wisselaar HA, Kroos MA, Hermans MM, van Beeumen J, Reuser AJ. *Structural and functional changes of lysosomal acid alpha-glucosidase during intracellular transport and maturation*. J Biol Chem 1993; 268(3):2223-31.
109. Kornfeld R, Kornfeld S. *Assembly of asparagine-linked oligosaccharides*. Annu Rev Biochem 1985; 54:631-64.
110. Hermans MM, Wisselaar HA, Kroos MA, Oostra BA, Reuser AJ. *Human lysosomal alpha-glucosidase: functional characterization of the glycosylation sites*. Biochem J 1993; 289(3):681-6.
111. Rothman JE, Katz FN, Lodish HF. *Glycosylation of a membrane protein is restricted to the growing polypeptide chain but is not necessary for insertion as a transmembrane protein*. Cell 1978; 15(4):1447-54.
112. Chen YT, Amalfitano A. *Towards a molecular therapy for glycogen storage disease type II (Pompe disease)*. Mol Med Today 2000; 6(6):245-51.
113. Marshall RD. *Glycoproteins*. Annu Rev Biochem 1972; 41:673-702.
114. Kornfeld S, Li E, Tabas I. *The synthesis of complex-type oligosaccharides. II. Characterization of the processing intermediates in the synthesis of the complex oligosaccharide units of the vesicular stomatitis virus G protein*. J Biol Chem 1978; 253(21):7771-8.

115. Hubbard SC, Robbins PW. *Synthesis and processing of protein-linked oligosaccharides in vivo*. J Biol Chem 1979; 254(11):4568-76.
116. Creek KE, Sly WS. *Biosynthesis and turnover of the phosphomannosyl receptor in human fibroblasts*. Biochem J 1983; 214(2):353-60.
117. Reitman ML, Kornfeld S. *UDP-N-acetylglucosamine:glycoprotein N-acetylglucosamine-1-phosphotransferase. Proposed enzyme for the phosphorylation of the high mannose oligosaccharide units of lysosomal enzymes*. J Biol Chem 1981; 256(9):4275-81.
118. Waheed A, Hasilik A, von Figura K. *Processing of the phosphorylated recognition marker in lysosomal enzymes. Characterization and partial purification of a microsomal alpha-N-acetylglucosaminyl phosphodiesterase*. J Biol Chem 1981; 256(11):5717-21.
119. Moreland RJ, Jin X, Zhang XK, Decker RW, Albee KL, Lee KL, et al. *Lysosomal acid alpha-glucosidase consists of four different peptides processed from a single chain precursor*. J Biol Chem 2005; 280(8):6780-91.
120. Creek KE, Sly WS. *Biosynthesis and turnover of the phosphomannosyl receptor in human fibroblasts*. Biochem J 1983; 214(2):353-60.
121. von Figura K, Hasilik A. *Lysosomal enzymes and their receptors*. Annu Rev Biochem 1986; 55:167-93.
122. Kornfeld S. *Trafficking of lysosomal enzymes*. FASEB J 1987; 1(6):462-8.
123. Pette D, Peuker H, Staron RS. *The impact of biochemical methods for single muscle fibre analysis*. Acta Physiol Scand 1999; 166(4):261-77.
124. McComas AJ. *Human neuromuscular adaptations that accompany changes in activity*. Med Sci Sports Exerc. 1994; 26(12):1498-509.
125. Bárány M. *ATPase activity of myosin correlated with speed of muscle shortening*. J Gen Physiol 1967; 50(6):197-218.
126. Staron RS. *Human skeletal muscle fiber types: delineation, development, and distribution*. Can J Appl Physiol 1997; 22(4):307-27.
127. Katz A, Sahlin K. *Regulation of lactic acid production during exercise*. J Appl Physiol 1988; 65(2):509-18.

128. Spriet LL, Watt MJ. *Regulatory mechanisms in the interaction between carbohydrate and lipid oxidation during exercise*. Acta Physiol Scand 2003; 178(4):443-52.
129. Katz A, Sahlin K, Broberg S. *Regulation of glucose utilization in human skeletal muscle during moderate dynamic exercise*. Am J Physiol 1991; 260(3):411-5.
130. Peter JB, Barnard RJ, Edgerton VR, Gillespie CA, Stempel KE. *Metabolic profiles of three fiber types of skeletal muscle in guinea pigs and rabbits*. Biochemistry 1972; 11(14):2627-33.
131. Essén B, Jansson E, Henriksson J, Taylor AW, Saltin B. *Metabolic characteristics of fibre types in human skeletal muscle*. Acta Physiol Scand 1975; 95(2):153-65.
132. Halkjaer-Kristensen J, Ingemann-Hansen T. *Microphotometric determination of glycogen in single fibres of human quadriceps muscle*. Histochem J 1979; 11(6):629-38.
133. Tsintzas OK, Williams C, Boobis L, Greenhaff P. *Carbohydrate ingestion and glycogen utilization in different muscle fibre types in man*. J Physiol 1995; 489(1):243-50.
134. Scott W, Stevens J, Binder-Macleod SA. *Human skeletal muscle fiber type classifications*. Phys Ther 2001; 81(11):1810-6.
135. Westerblad H, Bruton JD, Katz A. *Skeletal muscle: energy metabolism, fiber types, fatigue and adaptability*. Exp Cell Res 2010; 316(18):3093-9.
136. Griffin JL. *Infantile acid maltase deficiency. I. Muscle fiber destruction after lysosomal rupture*. Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol 1984; 45(1):23-36.
137. Amalfitano A, Bengur AR, Morse RP, Majure JM, Case LE, Veerling DL, et al. *Recombinant human acid alpha-glucosidase enzyme therapy for infantile glycogen storage disease type II: results of a phase I/II clinical trial*. Genet Med 2001; 3(2):132-8.
138. Kishnani PS, Nicolino M, Voit T, Rogers RC, Tsai AC, Waterson J, et al. *Chinese hamster ovary cell-derived recombinant human acid alpha-glucosidase in infantile-onset Pompe disease*. J Pediatr 2006; 149(1):89-97.
139. Raben N, Danon M, Gilbert AL, Dwivedi S, Collins B, Thurberg BL, et al. *Enzyme replacement therapy in the mouse model of Pompe disease*. Mol Genet Metab 2003; 80(1-2):159-69.

140. Thurberg BL, Lynch Maloney C, Vaccaro C, Afonso K, Tsai AC, Bossen E, et al. ***Characterization of pre- and post-treatment pathology after enzyme replacement therapy for Pompe disease.*** Lab Invest 2006; 86(12):1208-20.
141. Berg TO, Fengsrud M, Strømhaug PE, Berg T, Seglen PO. ***Isolation and characterization of rat liver amphisomes. Evidence for fusion of autophagosomes with both early and late endosomes.*** J Biol Chem 1998; 273(34):21883-92.
142. Liou W, Geuze HJ, Geelen MJ, Slot JW. ***The autophagic and endocytic pathways converge at the nascent autophagic vacuoles.*** J Cell Biol 1997; 136(1):61-70.
143. Mizushima N. ***The pleiotropic role of autophagy: from protein metabolism to bactericide.*** Cell Death Differ 2005; 12(2):1535-41.
144. Shea L, Raben N. ***Autophagy in skeletal muscle: implications for Pompe disease.*** Int J Clin Pharmacol Ther 2009; 47(1):42-7.
145. Fukuda T, Ewan L, Bauer M, Mattaliano RJ, Zaal K, Ralston E, et al. ***Dysfunction of endocytic and autophagic pathways in a lysosomal storage disease.*** Ann Neurol 2006; 59(4):700-8.
146. Mizushima N, Levine B. ***Autophagy in mammalian development and differentiation.*** Nat Cell Biol 2010; 12(9):823-30.
147. Schiaffino S, Hanzlíková V. ***Autophagic degradation of glycogen in skeletal muscles of the newborn rat.*** J Cell Biol 1972; 52(1):41-51.
148. Kotoulas OB, Kalamidas SA, Kondomerkos DJ. ***Glycogen autophagy in glucose homeostasis.*** Pathol Res Pract 2006; 202(9):631-8.
149. Kondomerkos DJ, Kalamidas SA, Kotoulas OB. ***An electron microscopic and biochemical study of the effects of glucagon on glycogen autophagy in the liver and heart of newborn rats.*** Microsc Res Tech 2004; 63(2):87-93.
150. Kalamidas SA, Kotoulas OB, Kotoulas AO, Maintas DB. ***The breakdown of glycogen in the lysosomes of newborn rat hepatocytes: the effects of glucose, cyclic 3',5'-AMP and caffeine.*** Histol Histopathol 1994; 9(4):691-8.
151. Kotoulas OB. ***The effects of cyclic 3',5'-AMP on the lysosomes of newborn rat hepatocytes.*** J Ultrastruct Mol Struct Res 1986; 97(1-3):210-5.

152. Lynch CM, Johnson J, Vaccaro C, Thurberg BL. ***High-resolution light microscopy (HRLM) and digital analysis of Pompe disease pathology.*** J Histochem Cytochem 2005; 53(1):63-73.
153. van der Ploeg AT, Reuser AJ. ***Pompe's disease.*** Lancet 2008; 372(9646):1342-53.
154. Winkel LP, Kamphoven JH, van den Hout HJ, Severijnen LA, van Doorn PA, Reuser AJ, et al. ***Morphological changes in muscle tissue of patients with infantile Pompe's disease receiving enzyme replacement therapy.*** Muscle Nerve 2003; 27(6):743-51.
155. Wierzba-Bobrowicz T, Lewandowska E, Lugowska A, Rola R, Stepień T, Ryglewicz D, et al. ***Adult glycogenosis type II (Pompe's disease): morphological abnormalities in muscle and skin biopsies compared with acid alpha-glucosidase activity.*** Folia Neuropathol 2007; 45(4):179-86.
156. Fukuda T, Roberts A, Plotz PH, Raben N. ***Acid alpha-glucosidase deficiency (Pompe disease).*** Curr Neurol Neurosci Rep 2007; 7(1):71-7.
157. Parenti G, Andria G. ***Pompe disease: from new views on pathophysiology to innovative therapeutic strategies.*** Curr Pharm Biotechnol 2011; 12(6):902-15.
158. Mellies U, Lofaso F. ***Pompe disease: a neuromuscular disease with respiratory muscle involvement.*** Respir Med 2009; 103(4):477-84.
159. Kishnani PS, Hwu WL, Mandel H, Nicolino M, Yong F, Corzo D, et al. ***A retrospective, multinational, multicenter study on the natural history of infantile-onset Pompe disease.*** J Pediatr 2006; 148(5):671-6.
160. van den Hout HM, Hop W, van Diggelen OP, Smeitink JA, Smit GP, Poll-The BT, et al. ***The natural course of infantile Pompe's disease: 20 original cases compared with 133 cases from the literature.*** Pediatrics 2003; 112(2):332-40.
161. Wan L, Lee CC, Hsu CM, Hwu WL, Yang CC, Tsai CH, et al. ***Identification of eight novel mutations of the acid alpha-glucosidase gene causing the infantile or juvenile form of glycogen storage disease type II.*** J Neurol 2008; 255(6):831-8.
162. Hagemans ML, Hop WJ, Van Doorn PA, Reuser AJ, Van der Ploeg AT. ***Course of disability and respiratory function in untreated late-onset Pompe disease.*** Neurology 2006; 66(4):581-3.

163. Van der Beek NA, Hagemans ML, Reuser AJ, Hop WC, Van der Ploeg AT, Van Doorn PA, et al. ***Rate of disease progression during long-term follow-up of patients with late-onset Pompe disease.*** *Neuromuscul Disord* 2009; 19(2):113-7.
164. Wokke JH, Escolar DM, Pestronk A, Jaffe KM, Carter GT, van den Berg LH, et al. ***Clinical features of late-onset Pompe disease: a prospective cohort study.*** *Muscle Nerve* 2008; 38(4):1236-45.
165. Winkel LP, Hagemans ML, van Doorn PA, Loonen MC, Hop WJ, Reuser AJ, et al. ***The natural course of non-classic Pompe's disease; a review of 225 published cases.*** *J Neurol* 2005; 252(8):875-84.
166. Hagemans ML, Winkel LP, Van Doorn PA, Hop WJ, Loonen MC, Reuser AJ, et al. ***Clinical manifestation and natural course of late-onset Pompe's disease in 54 Dutch patients.*** *Brain* 2005; 128(3):671-7.
167. Hagemans ML, Laforêt P, Hop WJ, Merkies IS, Van Doorn PA, Reuser AJ, et al. ***Impact of late-onset Pompe disease on participation in daily life activities: evaluation of the Rotterdam Handicap Scale.*** *Neuromuscul Disord* 2007; 17(7):537-43.
168. Alonso Ruiz A, Manrique Martínez P. ***Manifestaciones osteoarticulares de las enfermedades por depósito lisosómico.*** *Semin Fund Esp Reumatol* 2007; 8(3):165-177.
169. Jones HN, Muller CW, Lin M, Banugaria SG, Case LE, Li JS, et al. ***Oropharyngeal dysphagia in infants and children with infantile Pompe disease.*** *Dysphagia* 2010; 25(4):277-83.
170. Katirji B, Kesner V, Hejal RB, Alsheklee A. ***Teaching NeuroImage: Axial muscle atrophy in adult-onset Pompe disease.*** *Neurology* 2008; 70(10):e36.
171. Amato AA. ***Acid maltase deficiency and related myopathies.*** *Neurol Clin* 2000; 18(1):151-65.
172. Hagemans ML, van Schie SP, Janssens AC, van Doorn PA, Reuser AJ, van der Ploeg AT. ***Fatigue: an important feature of late-onset Pompe disease.*** *J Neurol* 2007; 254(7):941-5.
173. de Vries JM, Hagemans ML, Bussmann JB, van der Ploeg AT, van Doorn PA. ***Fatigue in neuromuscular disorders: focus on Guillain-Barré syndrome and Pompe disease.*** *Cell Mol Life Sci* 2010; 67(5):701-13.

174. Finder JD, Birnkrant D, Carl J, Farber HJ, Gozal D, Iannaccone ST, et al. ***Respiratory care of the patient with Duchenne muscular dystrophy: ATS consensus statement.*** Am J Respir Crit Care Med 2004; 170(4):456-65.
175. Mellies U, Ragette R, Schwake C, Baethmann M, Voit T, Teschler H. ***Sleep-disordered breathing and respiratory failure in acid maltase deficiency.*** Neurology 2001; 57(7):1290-5.
176. Pellegrini N, Laforet P, Orlikowski D, Pellegrini M, Caillaud C, Eymard B, et al. ***Respiratory insufficiency and limb muscle weakness in adults with Pompe's disease.*** Eur Respir J 2005; 26(6):1024-31.
177. Moufarrej NA, Bertorini TE. ***Respiratory insufficiency in adult-type acid maltase deficiency.*** South Med J 1993; 86(5):560-7.
178. Mellies U, Stehling F, Dohna-Schwake C, Ragette R, Teschler H, Voit T. ***Respiratory failure in Pompe disease: treatment with noninvasive ventilation.*** Neurology 2005; 64(8):1465-7.
179. Arens R, Muzumdar H. ***Sleep, sleep disordered breathing, and nocturnal hypoventilation in children with neuromuscular diseases.*** Paediatr Respir Rev 2010; 11(1):24-30.
180. Hagemans ML, Winkel LP, Hop WC, Reuser AJ, Van Doorn PA, Van der Ploeg AT. ***Disease severity in children and adults with Pompe disease related to age and disease duration.*** Neurology 2005; 64(12):2139-41.
181. Fayssoil A. ***Cardiomyopathy in Pompe's disease.*** Eur J Intern Med 2008; 19(1):57-9.
182. Levine JC, Kishnani PS, Chen YT, Herlong JR, Li JS. ***Cardiac remodeling after enzyme replacement therapy with acid alpha-glucosidase for infants with Pompe disease.*** Pediatr Cardiol 2008; 29(6):1033-42.
183. Kretschmar HA, Wagner H, Hübner G, Danek A, Witt TN, Mehraein P. ***Aneurysms and vacuolar degeneration of cerebral arteries in late-onset acid maltase deficiency.*** J Neurol Sci 1990; 98(2-3):169-83.
184. Refai D, Lev R, Cross DT, Shimony JS, Leonard JR. ***Thrombotic complications of a basilar artery aneurysm in a young adult with Pompe disease.*** Surg Neurol 2008; 70(5):518-20.

185. Kishnani PS, Howell RR. *Pompe disease in infants and children*. J Pediatr 2004; 144(5):35-43.
186. Walker RH, Jung HH, Danek A. *Diagnostic evaluation of clinically normal subjects with chronic hyperCKemia*. Neurology 2007; 68(7):535-6.
187. Di Fiore MT, Manfredi R, Marri L, Zucchini A, Azzaroli L, Manfredi G. *Elevation of transaminases as an early sign of late-onset glycogenosis type II*. Eur J Pediatr 1993; 152(9):784.
188. An Y, Young SP, Hillman SL, Van Hove JL, Chen YT, Millington DS. *Liquid chromatographic assay for a glucose tetrasaccharide, a putative biomarker for the diagnosis of Pompe disease*. Anal Biochem 2000; 287(1):136-43.
189. Young SP, Stevens RD, An Y, Chen YT, Millington DS. *Analysis of a glucose tetrasaccharide elevated in Pompe disease by stable isotope dilution-electrospray ionization tandem mass spectrometry*. Anal Biochem 2003; 316(2):175-80.
190. An Y, Young SP, Kishnani PS, Millington DS, Amalfitano A, Corz D, et al. *Glucose tetrasaccharide as a biomarker for monitoring the therapeutic response to enzyme replacement therapy for Pompe disease*. Mol Genet Metab 2005; 85(4):247-54.
191. Katzin LW, Amato AA. *Pompe disease: a review of the current diagnosis and treatment recommendations in the era of enzyme replacement therapy*. J Clin Neuromuscul Dis 2008; 9(4):421-31.
192. Kishnani PS, Steiner RD, Bali D, Berger K, Byrne BJ, Case LE, et al. *Pompe disease diagnosis and management guideline*. Genet Med 2006; 8(5):267-88.
193. Al-Lozi MT, Amato AA, Barohn RJ, Cupler EJ, Kishnani PS, Leshner RT, et al. *Diagnostic criteria for late-onset (childhood and adult) Pompe disease*. Muscle Nerve 2009; 40(1):149-60.
194. Kumlien J, Chester MA, Lindberg BS, Pizzo P, Zopf D, Lundblad A. *Urinary excretion of a glucose-containing tetrasaccharide. A parameter for increased degradation of glycogen*. Clin Chim Acta 1988; 176(1):39-48.
195. Young SP, Zhang H, Corzo D, Thurberg BL, Bali D, Kishnani PS, et al. *Long-term monitoring of patients with infantile-onset Pompe disease on enzyme replacement therapy using a urinary glucose tetrasaccharide biomarker*. Genet Med 2009; 11(7):536-41.

196. Reuser AJ, Kroos MA, Hermans MM, Bijvoet AG, Verbeet MP, Van Diggelen OP, et al. *Glycogenosis type II (acid maltase deficiency)*. Muscle Nerve 1995; 3:S61-9.
197. Kallwass H, Carr C, Gerrein J, Titlow M, Pomponio R, Bali D, et al. *Rapid diagnosis of late-onset Pompe disease by fluorometric assay of alpha-glucosidase activities in dried blood spots*. Mol Genet Metab 2007; 90(4):449-52.
198. Winchester B, Bali D, Bodamer OA, Caillaud C, Christensen E, Cooper A, et al. *Methods for a prompt and reliable laboratory diagnosis of Pompe disease: report from an international consensus meeting*. Mol Genet Metab 2008; 93(3):275-81.
199. Matsui H, Sasaki M, Takemasa E, Kaneta T, Chiba S. *Kinetic studies on the substrate specificity and active site of rabbit muscle acid alpha-glucosidase*. J Biochem 1984; 96(4):993-1004.
200. Zhang H, Kallwass H, Young SP, Carr C, Dai J, Kishnani PS, et al. *Comparison of maltose and acarbose as inhibitors of maltase-glucoamylase activity in assaying acid alpha-glucosidase activity in dried blood spots for the diagnosis of infantile Pompe disease*. Genet Med 2006; 8(5):302-6.
201. Jack RM, Gordon C, Scott CR, Kishnani PS, Bali D. *The use of acarbose inhibition in the measurement of acid alpha-glucosidase activity in blood lymphocytes for the diagnosis of Pompe disease*. Genet Med 2006; 8(5):307-12.
202. van der Ploeg AT, Kroos M, van Dongen JM, Visser WJ, Bolhuis PA, Loonen MC, et al. *Breakdown of lysosomal glycogen in cultured fibroblasts from glycogenosis type II patients after uptake of acid alpha-glucosidase*. J Neurol Sci 1987; 79(3):327-36.
203. Umaphysivam K, Hopwood JJ, Meikle PJ. *Correlation of acid alpha-glucosidase and glycogen content in skin fibroblasts with age of onset in Pompe disease*. Clin Chim Acta 2005; 361(1-2):191-8.
204. Pauly DF, Johns DC, Matelis LA, Lawrence JH, Byrne BJ, Kessler PD. *Complete correction of acid alpha-glucosidase deficiency in Pompe disease fibroblasts in vitro, and lysosomally targeted expression in neonatal rat cardiac and skeletal muscle*. Gene Ther 1998; 5(4):473-80.
205. McFarlane HJ, Soni N. *Pompe's disease and anaesthesia*. Anaesthesia 1986; 41(12):1219-24.

206. Rosen KR, Broadman LM. *Anaesthesia for diagnostic muscle biopsy in an infant with Pompe's disease*. Can Anaesth Soc J 1986; 33(6):790-4.
207. Lukacs Z, Nieves Cobos P, Mengel E, Hartung R, Beck M, Deschauer M, et al. *Diagnostic efficacy of the fluorometric determination of enzyme activity for Pompe disease from dried blood specimens compared with lymphocytes-possibility for newborn screening*. J Inherit Metab Dis 2010; 33(1):43-50.
208. Taniguchi N, Kato E, Yoshida H, Iwaki S, Ohki T, Koizumi S. *Alpha-glucosidase activity in human leucocytes: choice of lymphocytes for the diagnosis of Pompe's disease and the carrier state*. Clin Chim Acta 1978; 89(2):293-9.
209. Seiler D, Kelleter R, Kölmel HW, Heene R. *Alpha-1,4-glucosidase activity in leucocytes and lymphocytes of 2 adult patients with glycogen-storage disease type II, (Pompe's disease)*. Experientia 1973; 29(8):972-3.
210. van der Ploeg AT, Clemens PR, Corzo D, Escolar DM, Florence J, Groeneveld GJ, et al. *A randomized study of alglucosidase alfa in late-onset Pompe's disease*. N Engl J Med 2010; 362(15):1396-406.
211. Mei JV, Alexander JR, Adam BW, Hannon WH. *Use of filter paper for the collection and analysis of human whole blood specimens*. J Nutr 2001; 131(5):1631-6.
212. Downing M, Pollitt R. *Newborn bloodspot screening in the UK – past, present and future*. Ann Clin Biochem 2008; 45(1):11-7.
213. Umapathysivam K, Hopwood JJ, Meikle PJ. *Determination of acid alpha-glucosidase activity in blood spots as a diagnostic test for Pompe disease*. Clin Chem 2001; 47(8):1378-83.
214. Chamoles NA, Niizawa G, Blanco M, Gaggioli D, Casentini C. *Glycogen storage disease type II: enzymatic screening in dried blood spots on filter paper*. Clin Chim Acta 2004; 347(1-2):97-102.
215. Kemper AR, Hwu WL, Lloyd-Puryear M, Kishnani PS. *Newborn screening for Pompe disease: synthesis of the evidence and development of screening recommendations*. Pediatrics 2007; 120(5):1327-34.
216. Chien YH, Lee NC, Thurberg BL, Chiang SC, Zhang XK, Keutzer J, et al. *Pompe disease in infants: improving the prognosis by newborn screening and early treatment*. Pediatrics 2009; 124(6):1116-25.

217. Goldstein JL, Young SP, Changela M, Dickerson GH, Zhang H, Dai J, et al. ***Screening for Pompe disease using a rapid dried blood spot method: experience of a clinical diagnostic laboratory.*** Muscle Nerve 2009; 40(1):32-6.
218. Lukacs Z, Nieves Cobos P, Mengel E, Hartung R, Beck M, Deschauer M, et al. ***Diagnostic efficacy of the fluorometric determination of enzyme activity for Pompe disease from dried blood specimens compared with lymphocytes-possibility for newborn screening.*** J Inherit Metab Dis 2010; 33(1):43-50.
219. Kishnani PS, Corzo D, Nicolino M, Byrne B, Mandel H, Hwu WL, et al. ***Recombinant human acid alpha-glucosidase: Major clinical benefits in infantile-onset Pompe disease.*** Neurology 2011; 77(17):1604.
220. Amalfitano A, Bengur AR, Morse RP, Majure JM, Case LE, Veerling DL, et al. ***Recombinant human acid alpha-glucosidase enzyme therapy for infantile glycogen storage disease type II: results of a phase I/II clinical trial.*** Genet Med 2001; 3(2):132-8.
221. Kishnani PS, Nicolino M, Voit T, Rogers RC, Tsai AC, Waterson J, et al. ***Chinese hamster ovary cell-derived recombinant human acid alpha-glucosidase in infantile-onset Pompe disease.*** J Pediatr 2006; 149(1):89-97.
222. Klinge L, Straub V, Neudorf U, Schaper J, Bosbach T, Görlinger K, et al. ***Safety and efficacy of recombinant acid alpha-glucosidase (rhGAA) in patients with classical infantile Pompe disease: results of a phase II clinical trial.*** Neuromuscul Disord 2005; 15(1):24-31
223. Winkel LP, Van den Hout JM, Kamphoven JH, Disseldorp JA, Remmerswaal M, Arts WF, et al. ***Enzyme replacement therapy in late-onset Pompe's disease: a three-year follow-up.*** Ann Neurol 2004; 55(4):495-502.
224. van Capelle CI, Winkel LP, Hagemans ML, Shapira SK, Arts WF, van Doorn PA, et al. ***Eight years experience with enzyme replacement therapy in two children and one adult with Pompe disease.*** Neuromuscul Disord 2008; 18(6):447-52.
225. Raben N, Fukuda T, Gilbert AL, de Jong D, Thurberg BL, Mattaliano RJ, et al. ***Replacing acid alpha-glucosidase in Pompe disease: recombinant and transgenic enzymes are equipotent, but neither completely clears glycogen from type II muscle fibers.*** Mol Ther 2005; 11(1):48-56.

226. Ravaglia S, Danesino C, Pichiecchio A, Repetto A, Poloni GU, Rossi M, et al. *Enzyme replacement therapy in severe adult-onset glycogen storage disease type II*. Adv Ther 2008; 25(8):820-9.
227. Merk T, Wibmer T, Schumann C, Krüger S. *Glycogen storage disease type II (Pompe disease)--influence of enzyme replacement therapy in adults*. Eur J Neurol 2009; 16(2):274-7.
228. Ravaglia S, Pichiecchio A, Ponzio M, Danesino C, Saeidi Garaghani K, Poloni GU, et al. *Changes in skeletal muscle qualities during enzyme replacement therapy in late-onset type II glycogenosis: temporal and spatial pattern of mass vs. strength response*. J Inherit Metab Dis 2010; 33(6):737-45.
229. Bijvoet AG, Kroos MA, Pieper FR, Van der Vliet M, De Boer HA, Van der Ploeg AT, et al. *Recombinant human acid alpha-glucosidase: high level production in mouse milk, biochemical characteristics, correction of enzyme deficiency in GSDII KO mice*. Hum Mol Genet 1998; 7(11):1815-24.
230. Van den Hout H, Reuser AJ, Vulto AG, Loonen MC, Cromme-Dijkhuis A, Van der Ploeg AT. *Recombinant human alpha-glucosidase from rabbit milk in Pompe patients*. Lancet 2000; 356(9227):397-8.
231. Van den Hout JM, Reuser AJ, de Klerk JB, Arts WF, Smeitink JA, Van der Ploeg AT. *Enzyme therapy for pompe disease with recombinant human alpha-glucosidase from rabbit milk*. J Inherit Metab Dis 2001; 24(2):266-74.
232. Van den Hout JM, Kamphoven JH, Winkel LP, Arts WF, De Klerk JB, Loonen MC, et al. *Long-term intravenous treatment of Pompe disease with recombinant human alpha-glucosidase from milk*. Pediatrics 2004; 113(5):448-57.
233. Fuller M, Van der Ploeg A, Reuser AJ, Anson DS, Hopwood JJ. *Isolation and characterisation of a recombinant, precursor form of lysosomal acid alpha-glucosidase*. Eur J Biochem 1995; 234(3):903-9.
234. Van Hove JL, Yang HW, Wu JY, Brady RO, Chen YT. *High-level production of recombinant human lysosomal acid alpha-glucosidase in Chinese hamster ovary cells which targets to heart muscle and corrects glycogen accumulation in fibroblasts from patients with Pompe disease*. Proc Natl Acad Sci U S A 1996; 93(1):65-70.

235. Reuser AJ, Van Den Hout H, Bijvoet AG, Kroos MA, Verbeet MP, Van Der Ploeg AT. *Enzyme therapy for Pompe disease: from science to industrial enterprise*. Eur J Pediatr 2002; 161(1):106-11.
236. Rossi M, Parenti G, Della Casa R, Romano A, Mansi G, Agovino T, et al. *Long-term enzyme replacement therapy for pompe disease with recombinant human alpha-glucosidase derived from chinese hamster ovary cells*. J Child Neurol 2007; 22(5):565-73.
237. Raben N, Lu N, Nagaraju K, Rivera Y, Lee A, Yan B, et al. *Conditional tissue-specific expression of the acid alpha-glucosidase (GAA) gene in the GAA knockout mice: implications for therapy*. Hum Mol Genet 2001; 10(19):2039-47.
238. Takikita S, Myerowitz R, Zaal K, Raben N, Plotz PH. *Murine muscle cell models for Pompe disease and their use in studying therapeutic approaches*. Mol Genet Metab 2009; 96(4):208-17.
239. Fujita T, Nonaka I, Sugita H. *Japanese quail and human acid maltase deficiency: a comparative study*. Brain Dev 1991; 13(4):247-55.
240. Kikuchi T, Yang HW, Pennybacker M, Ichihara N, Mizutani M, Van Hove JL, et al. *Clinical and metabolic correction of pompe disease by enzyme therapy in acid maltase-deficient quail*. J Clin Invest 1998; 101(4):827-33.
241. Klinge L, Straub V, Neudorf U, Voit T. *Enzyme replacement therapy in classical infantile pompe disease: results of a ten-month follow-up study*. Neuropediatrics 2005; 36(1):6-11.
242. Tanzer F, Buyukkayhan D, Cansu Mutlu E, Kalender Korkmaz F. *Enzyme replacement therapy in an infant with Pompe's disease with severe cardiomyopathy*. J Pediatr Endocrinol Metab 2009; 22(12):1159-62.
243. Chen LR, Chen CA, Chiu SN, Chien YH, Lee NC, Lin MT, et al. *Reversal of cardiac dysfunction after enzyme replacement in patients with infantile-onset Pompe disease*. J Pediatr 2009; 155(2):271-5.2.
244. Ansong AK, Li JS, Nozik-Grayck E, Ing R, Kravitz RM, Idriss SF, et al. *Electrocardiographic response to enzyme replacement therapy for Pompe disease*. Genet Med 2006; 8(5):297-301.
245. van Capelle CI, van der Beek NA, Hagemans ML, Arts WF, Hop WC, Lee P, et al. *Effect of enzyme therapy in juvenile patients with Pompe disease: a three-year open-label study*. Neuromuscul Disord 2010; 20(12):775-82.

246. Kobayashi H, Shimada Y, Ikegami M, Kawai T, Sakurai K, Urashima T, et al. ***Prognostic factors for the late onset Pompe disease with enzyme replacement therapy: from our experience of 4 cases including an autopsy case.*** Mol Genet Metab 2010; 100(1):14-9.
247. Pichiecchio A, Poloni GU, Ravaglia S, Ponzio M, Germani G, Maranzana D, et al. ***Enzyme replacement therapy in adult-onset glycogenosis II: is quantitative muscle MRI helpful?*** Muscle Nerve 2009; 40(1):122-5.
248. Zhu Y, Li X, Kyazike J, Zhou Q, Thurberg BL, Raben N, et al. ***Conjugation of mannose 6-phosphate-containing oligosaccharides to acid alpha-glucosidase improves the clearance of glycogen in pompe mice.*** J Biol Chem 2004; 279(48):50336-41.
249. Zhu Y, Li X, McVie-Wylie A, Jiang C, Thurberg BL, Raben N, et al. ***Carbohydrate-remodelled acid alpha-glucosidase with higher affinity for the cation-independent mannose 6-phosphate receptor demonstrates improved delivery to muscles of Pompe mice.*** Biochem J 2005; 389(3):619-28.
250. Dingermann T. ***Recombinant therapeutic proteins: production platforms and challenges.*** Biotechnol J 2008; 3(1):90-7.
251. McVie-Wylie AJ, Lee KL, Qiu H, Jin X, Do H, Gotschall R, et al. ***Biochemical and pharmacological characterization of different recombinant acid alpha-glucosidase preparations evaluated for the treatment of Pompe disease.*** Mol Genet Metab 2008; 94(4):448-55.
252. European Medicines Agency. ***Assessment report for Myozyme®.*** Doc. Ref: EMEA/CHMP/631070/2009. Disponible en: [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/EPAR\\_-\\_Assessment\\_Report\\_-\\_Variation/human/000636/WC500059181.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Assessment_Report_-_Variation/human/000636/WC500059181.pdf)
253. Chien YH, Lee NC, Huang HJ, Thurberg BL, Tsai FJ, Hwu WL. ***Later-onset Pompe disease: early detection and early treatment initiation enabled by newborn screening.*** J Pediatr 2011; 158(6):1023-7.
254. Hamdan MA, Almalik MH, Mirghani HM. ***Early administration of enzyme replacement therapy for Pompe disease: short-term follow-up results.*** J Inherit Metab Dis 2008; 31(2):431-6.
255. Hamdan MA, El-Zoabi BA, Begam MA, Mirghani HM, Almalik MH. ***Antenatal diagnosis of pompe disease by fetal echocardiography: impact on outcome after***

- early initiation of enzyme replacement therapy*. J Inherit Metab Dis 2010 Sep 4. [Epub ahead of print]
256. Ing RJ, Cook DR, Bengur RA, Williams EA, Eck J, Dear Gde L, et al. ***Anaesthetic management of infants with glycogen storage disease type II: a physiological approach***. Paediatr Anaesth 2004; 14(6):514-9.
257. Case LE, Hanna R, Frush DP, Krishnamurthy V, DeArme y S, Mackey J, et al. ***Fractures in children with Pompe disease: a potential long-term complication***. Pediatr Radiol 2007; 37(5):437-45.
258. van Capelle CI, Goedegebure A, Homans NC, Hoeve HL, Reuser AJ, van der Ploeg AT. ***Hearing loss in Pompe disease revisited: results from a study of 24 children***. J Inherit Metab Dis 2010; 33(5):597-602.
259. van der Beek NA, Hagemans ML, van der Ploeg AT, Reuser AJ, van Doorn PA. ***Pompe disease (glycogen storage disease type II): clinical features and enzyme replacement therapy***. Acta Neurol Belg 2006; 106(2):82-6.
260. Schoser B, Hill V, Raben N. ***Therapeutic approaches in glycogen storage disease type II/Pompe Disease***. Neurotherapeutics 2008; 5(4):569-78.
261. Angelini C, Semplicini C, Tonin P, Filosto M, Pegoraro E, Sorarù G, et al. ***Progress in Enzyme Replacement Therapy in Glycogen Storage Disease Type II***. Ther Adv Neurol Disord 2009; 2(3):143-53.
262. Bembi B, Pisa FE, Confalonieri M, Ciana G, Fiumara A, Parini R, et al. ***Long-term observational, non-randomized study of enzyme replacement therapy in late-onset glycogenosis type II***. J Inherit Metab Dis 2010; 33(6):727-35.
263. Strothotte S, Strigl-Pill N, Grunert B, Kornblum C, Eger K, Wessig C, et al. ***Enzyme replacement therapy with alglucosidase alfa in 44 patients with late-onset glycogen storage disease type 2: 12-month results of an observational clinical trial***. J Neurol 2010; 257(1):91-7.
264. Furusawa Y, Mori-Yoshimura M, Yamamoto T, Sakamoto C, Wakita M, Kobayashi Y, et al. ***Effects of enzyme replacement therapy on five patients with advanced late-onset glycogen storage disease type II: a 2-year follow-up study***. J Inherit Metab Dis 2012; 35(2):301-10.
265. Angelini C, Semplicini C. ***Enzyme Replacement Therapy for Pompe Disease***. Curr Neurol Neurosci Rep 2011 Oct 15. [Epub ahead of print]

266. Angelini C, Semplicini C, Ravaglia S, Bembi B, Servidei S, Pegoraro E, et al. ***Observational clinical study in juvenile-adult glycogenosis type 2 patients undergoing enzyme replacement therapy for up to 4 years.*** J Neurol 2011 Nov 12. [Epub ahead of print]
267. Orlikowski D, Pellegrini N, Prigent H, Laforêt P, Carlier R, Carlier P, et al. ***Recombinant human acid alpha-glucosidase (rhGAA) in adult patients with severe respiratory failure due to Pompe disease.*** Neuromuscul Disord 2011; 21(7):477-82.
268. de Vries JM, van der Beek NA, Kroos MA, Ozkan L, van Doorn PA, Richards SM, et al. ***High antibody titer in an adult with Pompe disease affects treatment with alglucosidase alfa.*** Mol Genet Metab 2010; 101(4):338-45.
269. Rohrbach M, Klein A, Köhli-Wiesner A, Veraguth D, Scheer I, Balmer C, et al. ***CRIM-negative infantile Pompe disease: 42-month treatment outcome.*** J Inherit Metab Dis 2010; 33(6):751-7.
270. Kishnani PS, Goldenberg PC, DeArme SL, Heller J, Benjamin D, Young S, et al. ***Cross-reactive immunologic material status affects treatment outcomes in Pompe disease infants.*** Mol Genet Metab 2010; 99(1):26-33.
271. Abbott MA, Prater SN, Banugaria SG, Richards SM, Young SP, Rosenberg AS, et al. ***Atypical immunologic response in a patient with CRIM-negative Pompe disease.*** Mol Genet Metab 2011; 104(4):583-6.
272. Richards SM. ***Immunologic considerations for enzyme replacement therapy in the treatment of lysosomal storage disorders.*** Clin Appl Immunol Rev 2002; 47(2):241-253
273. Slonim AE, Coleman RA, McElligot MA, Najjar J, Hirschhorn K, Labadie GU, et al. ***Improvement of muscle function in acid maltase deficiency by high-protein therapy.*** Neurology 1983; 33(1):34-8.
274. Slonim AE, Bulone L, Goldberg T, Minikes J, Slonim E, Galanko J, et al. ***Modification of the natural history of adult-onset acid maltase deficiency by nutrition and exercise therapy.*** Muscle Nerve 2007; 35(1):70-7.
275. Papadimas GK, Terzis G, Papadopoulos C, Spengos K, Manta P. ***The importance of nutritional status in the prognosis of late onset Pompe disease.*** Mol Genet Metab 2010; 100(4):389.
276. Terzis G, Dimopoulos F, Papadimas GK, Papadopoulos C, Spengos K, Fatouros I, et al. ***Effect of aerobic and resistance exercise training on late-onset Pompe***

- disease patients receiving enzyme replacement therapy*. Mol Genet Metab 2011; 104(3):279-83.
277. Case LE, Kishnani PS. *Physical therapy management of Pompe disease*. Genet Med 2006; 8(5):318-27.
278. Bodamer OA, Halliday D, Leonard JV. *The effects of l-alanine supplementation in late-onset glycogen storage disease type II*. Neurology 2000; 55(5):710-2.
279. Mundy HR, Williams JE, Cousins AJ, Lee PJ. *The effect of L-alanine therapy in a patient with adult onset glycogen storage disease type II*. J Inherit Metab Dis 2006; 29(1):226-9.
280. Mobarhan S, Pintozzi RL, Damle P, Friedman H. *Treatment of acid maltase deficiency with a diet high in branched-chain amino acids*. JPEN J Parenter Enteral Nutr 1990; 14(2):210-2.
281. Bodamer OA, Leonard JV, Halliday D. *Dietary treatment in late-onset acid maltase deficiency*. Eur J Pediatr 1997; 156(1):39-42.
282. Ravaglia S, Pichiecchio A, Rossi M, Filippi PD, Minelli A, Moglia A, et al. *Dietary treatment in adult-onset type II glycogenosis*. J Inherit Metab Dis 2006; 29(4):590.
283. Harber MP, Schenk S, Barkan AL, Horowitz JF. *Effects of dietary carbohydrate restriction with high protein intake on protein metabolism and the somatotrophic axis*. J Clin Endocrinol Metab 2005; 90(9):5175-81.
284. Umpleby AM, Wiles CM, Trend PS, Scobie IN, Macleod AF, Spencer GT, et al. *Protein turnover in acid maltase deficiency before and after treatment with a high protein diet*. J Neurol Neurosurg Psychiatr 1987; 50(5):587-92.
285. Umpleby AM, Trend PS, Chubb D, Conaglen JV, Williams CD, Hesp R, et al. *The effect of a high protein diet on leucine and alanine turnover in acid maltase deficiency*. J Neurol Neurosurg Psychiatry 1989; 52(8):954-61.
286. Hurley BF, Nemeth PM, Martin WH 3rd, Hagberg JM, Dalsky GP, Holloszy JO. *Muscle triglyceride utilization during exercise: effect of training*. J Appl Physiol 1986; 60(2):562-7.
287. Gollnick PD, Armstrong RB, Saubert CW, Piehl K, Saltin B. *Enzyme activity and fiber composition in skeletal muscle of untrained and trained men*. J Appl Physiol 1972; 33(3):312-9.

288. Majeski AE, Dice JF. *Mechanisms of chaperone-mediated autophagy*. Int J Biochem Cell Biol 2004; 36(12):2435-44.
289. Slonim AE, Bulone L, Minikes J, Hays AP, Shanske S, Tsujino S, et al. *Benign course of glycogen storage disease type IIb in two brothers: nature or nurture?* Muscle Nerve 2006; 33(4):571-4.
290. Niu DM, Lin HY, Wu TJ, Hsu JH, Yu HC, Lin SP, et al. *Novel human pathological mutations. Gene symbol: GAA. Disease: glycogen storage disease 2*. Hum Genet 2010; 127(4):465.
291. Cheng SH, Smith AE. *Gene therapy progress and prospects: gene therapy of lysosomal storage disorders*. Gene Ther 2003; 10(16):1275-81.
292. Byrne BJ, Falk DJ, Pacak CA, Nayak S, Herzog RW, Elder ME, et al. *Pompe disease gene therapy*. Hum Mol Genet 2011; 20(1):61-8.
293. Richard E, Douillard-Guilloux G, Caillaud C. *New insights into therapeutic options for Pompe disease*. IUBMB Life 2011; 63(11):979-86.
294. Ding E, Hu H, Hodges BL, Migone F, Serra D, Xu F, et al. *Efficacy of gene therapy for a prototypical lysosomal storage disease (GSD-II) is critically dependent on vector dose, transgene promoter, and the tissues targeted for vector transduction*. Mol Ther 2002; 5(4):436-46.
295. Xu F, Ding E, Migone F, Serra D, Schneider A, Chen YT, et al. *Glycogen storage in multiple muscles of old GSD-II mice can be rapidly cleared after a single intravenous injection with a modified adenoviral vector expressing hGAA*. J Gene Med 2005; 7(2):171-8.
296. Sun B, Young SP, Li P, Di C, Brown T, Salva MZ, et al. *Correction of multiple striated muscles in murine Pompe disease through adeno-associated virus-mediated gene therapy*. Mol Ther 2008; 16(8):1366-71.
297. Cresawn KO, Fraites TJ, Wasserfall C, Atkinson M, Lewis M, Porvasnik S, et al. *Impact of humoral immune response on distribution and efficacy of recombinant adeno-associated virus-derived acid alpha-glucosidase in a model of glycogen storage disease type II*. Hum Gene Ther 2005; 16(1):68-80.
298. Kosuga M, Takahashi S, Sasaki K, Li XK, Fujino M, Hamada H, et al. *Adenovirus-mediated gene therapy for mucopolysaccharidosis VII: involvement of cross-correction in wide-spread distribution of the gene products and long-term effects of CTLA-4Ig coexpression*. Mol Ther 2000; 1(5):406-13.

299. Wang J, Lozier J, Johnson G, Kirshner S, Verthelyi D, Pariser A, et al. *Neutralizing antibodies to therapeutic enzymes: considerations for testing, prevention and treatment*. Nat Biotechnol 2008; 26(8):901-8.
300. McCaffrey AP, Fawcett P, Nakai H, McCaffrey RL, Ehrhardt A, Pham TT, et al. *The host response to adenovirus, helper-dependent adenovirus, and adeno-associated virus in mouse liver*. Mol Ther 2008; 16(5):931-41.
301. Zaiss AK, Liu Q, Bowen GP, Wong NC, Bartlett JS, Muruve DA. *Differential activation of innate immune responses by adenovirus and adeno-associated virus vectors*. J Virol 2002; 76(9):4580-90.
302. Ahi YS, Bangari DS, Mittal SK. *Adenoviral vector immunity: its implications and circumvention strategies*. Curr Gene Ther 2011; 11(4):307-20.
303. Zaretsky JZ, Candotti F, Boerkoel C, Adams EM, Yewdell JW, Blaese RM, et al. *Retroviral transfer of acid alpha-glucosidase cDNA to enzyme-deficient myoblasts results in phenotypic spread of the genotypic correction by both secretion and fusion*. Hum Gene Ther 1997; 8(13):1555-63.
304. Ferry N, Pichard V, Aubert D, Bony S, Nguyen TH. *Retroviral Vector-Mediated Gene Therapy for Metabolic Diseases: An Update*. Curr Pharm Des 2011; 17(24):2516-27.
305. Nowrouzi A, Glimm H, von Kalle C, Schmidt M. *Retroviral vectors: post entry events and genomic alterations*. Viruses 2011; 3(5):429-55.
306. Naldini L, Blömer U, Gallay P, Ory D, Mulligan R, Gage FH, et al. *In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector*. Science 1996; 272(5259):263-7.
307. Richard E, Douillard-Guilloux G, Batista L, Caillaud C. *Correction of glycogenosis type 2 by muscle-specific lentiviral vector*. In Vitro Cell Dev Biol Anim 2008; 44(10):397-406.
308. van Til NP, Stok M, Aerts Kaya FS, de Waard MC, Farahbakhshian E, Visser TP, et al. *Lentiviral gene therapy of murine hematopoietic stem cells ameliorates the Pompe disease phenotype*. Blood 2010 ;115(26):5329-37.
309. Hamanaka R, Shinohara T, Yano S, Nakamura M, Yasuda A, Yokoyama S, et al. *Rescue of mutant alpha-galactosidase A in the endoplasmic reticulum by 1-deoxygalactonojirimycin leads to trafficking to lysosomes*. Biochim Biophys Acta 2008; 1782(6):408-13.

310. Okumiya T, Kroos MA, Vliet LV, Takeuchi H, Van der Ploeg AT, Reuser AJ. *Chemical chaperones improve transport and enhance stability of mutant alpha-glucosidases in glycogen storage disease type II*. Mol Genet Metab 2007; 90(1):49-57.
311. Flanagan JJ, Rossi B, Tang K, Wu X, Mascioli K, Donaudy F, et al. *The pharmacological chaperone 1-deoxynojirimycin increases the activity and lysosomal trafficking of multiple mutant forms of acid alpha-glucosidase*. Hum Mutat 2009; 30(12):1683-92.
312. Hermans MM, van Leenen D, Kroos MA, Beesley CE, Van Der Ploeg AT, Sakuraba H, et al. *Twenty-two novel mutations in the lysosomal alpha-glucosidase gene (GAA) underscore the genotype-phenotype correlation in glycogen storage disease type II*. Hum Mutat 2004; 23(1):47-56.
313. Huie ML, Tsujino S, Sklower Brooks S, Engel A, Elias E, Bonthron DT, et al. *Glycogen storage disease type II: identification of four novel missense mutations (D645N, G648S, R672W, R672Q) and two insertions/deletions in the acid alpha-glucosidase locus of patients of differing phenotype*. Biochem Biophys Res Commun 1998; 244(3):921-7.
314. Parenti G. *Treating lysosomal storage diseases with pharmacological chaperones: from concept to clinics*. EMBO Mol Med 2009; 1(5):268-79.
315. Valenzano KJ, Khanna R, Powe AC, Boyd R, Lee G, Flanagan JJ, et al. *Identification and characterization of pharmacological chaperones to correct enzyme deficiencies in lysosomal storage disorders*. Assay Drug Dev Technol 2011; 9(3):213-35.
316. Parenti G, Zuppaldi A, Gabriela Pittis M, Rosaria Tuzzi M, Annunziata I, Meroni G, et al. *Pharmacological enhancement of mutated alpha-glucosidase activity in fibroblasts from patients with Pompe disease*. Mol Ther 2007; 15(3):508-14.
317. Porto C, Cardone M, Fontana F, Rossi B, Tuzzi MR, Tarallo A, et al. *The pharmacological chaperone N-butyldeoxynojirimycin enhances enzyme replacement therapy in Pompe disease fibroblasts*. Mol Ther 2009; 17(6):964-71.
318. Cox TM. *Biomarkers in lysosomal storage diseases: a review*. Acta Paediatr Suppl 2005; 94(447):39-42.

319. Martins AM. *Introduction to Brazilian Guidelines to Diagnosis, Treatment, and Monitoring for Gaucher Disease, Fabry Disease, Mucopolysaccharidosis I, and Pompe Disease*. J Pediatr 2009; 155(4):S9.
320. Hawes ML, Kennedy W, O'Callaghan MW, Thurberg BL. *Differential muscular glycogen clearance after enzyme replacement therapy in a mouse model of Pompe disease*. Mol Genet Metab 2007; 91(4):343-51.
321. Ugorski M, Seder A, Lundblad A, Zopf D. *Studies on the metabolic origin of a glucose-containing tetrasaccharide in human urine*. J Exp Pathol. 1983; 1(1):27-38.
322. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. *Protein measurement with the Folin phenol reagent*. J Biol Chem. 1951;193(1):265-75.
323. Manwaring V, Prunty H, Bainbridge K, Burke D, Finnegan N, Franses R, et al. *Erratum to: Urine analysis of glucose tetrasaccharide by HPLC; a useful marker for the investigation of patients with Pompe and other glycogen storage diseases*. J Inherit Metab Dis 2012; 35(2):311-6.
324. Young SP, Stevens RD, An Y, Chen YT, Millington DS. *Analysis of a glucose tetrasaccharide elevated in Pompe disease by stable isotope dilution-electrospray ionization tandem mass spectrometry*. Anal Biochem 2003; 316(2):175-80.
325. Wraith JE. *Limitations of enzyme replacement therapy: current and future*. J Inherit Metab Dis 2006; 29(2-3):442-7.
326. Beck M. *New therapeutic options for lysosomal storage disorders: enzyme replacement, small molecules and gene therapy*. Hum Genet 2007; 121(1):1-22.
327. Zopf DA, Levinson RE, Lundblad A. *Determination of a glucose-containing tetrasaccharide in urine by radioimmunoassay*. J Immunol Methods 1982; 48(1):109-19.
328. Wang WT, Kumlien J, Ohlson S, Lundblad A, Zopf D. *Analysis of a glucose-containing tetrasaccharide by high-performance liquid affinity chromatography*. Anal Biochem 1989; 182(1):48-53.
329. Oberholzer K, Sewell AC. *Unique oligosaccharide (apparently glucotetrasaccharide) in urine of patients with glycogen storage diseases*. Clin Chem 1990; 36(7):1381.
330. Peelen GO, de Jong JG, Wevers RA. *HPLC analysis of oligosaccharides in urine from oligosaccharidosis patients*. Clin Chem 1994; 40(6):914-21.

331. Poulter L, Burlingame AL. *Desorption mass spectrometry of oligosaccharides coupled with hydrophobic chromophores*. Methods Enzymol 1990; 193(1):661-89.
332. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, et al. *Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase*. Science 1988; 239(4839):487-91.
333. Carman WF, Kidd AH. *An assessment of optimal conditions for amplification of HIV cDNA using Thermus aquaticus polymerase*. J Virol Methods 1989; 23(3):277-89.
334. Zweig MH. *Inefficiency of diagnostic efficiency*. Clin Chem 1992; 38(1):163-4.
335. Linden A. *Measuring diagnostic and predictive accuracy in disease management: an introduction to receiver operating characteristic (ROC) analysis*. J Eval Clin Pract. 2006;12(2):132-9.





La Enfermedad de Pompe es una enfermedad rara con un espectro de manifestaciones musculares, cardíacas y respiratorias que pueden aparecer a cualquier edad y que, según su gravedad y edad de aparición, pueden suponer una mayor morbimortalidad para los pacientes que la padecen.

Desde la aprobación de la terapia de sustitución enzimática para esta patología los enfermos cuentan con un tratamiento que cambia radicalmente el pronóstico de la enfermedad, su evolución y su calidad de vida.

Por este motivo, se hace imprescindible mejorar, no sólo los sistemas diagnósticos, sino también el conocimiento de esta enfer-

medad por los clínicos, para poder actuar antes y mejor sobre esta patología.

Intentando alcanzar esta meta, he considerado importante destacar el papel que el Laboratorio Clínico puede representar en el diagnóstico de estos enfermos y he creído conveniente participar con esta Tesis en la divulgación de los conocimientos disponibles hoy día sobre esta enfermedad aportando, con ello, mi grano de arena.