

**IDENTIFICACIÓN DE VARIANTES GENÓMICAS DEL GEN *GBA* EN
PACIENTES CON PATOLOGÍAS DIFERENTES Y NO DIAGNOSTICADOS
CLINICAMENTE CON ENFERMEDAD DE GAUCHER EN EL
SUROCCIDENTE COLOMBIANO**

**DANIELA ARTURO TERRANOVA
BIÓLOGA**

**UNIVERSIDAD DEL VALLE
FACULTAD DE SALUD
ESCUELA DE CIENCIAS BÁSICAS
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FISIOLÓGICAS
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS - 7670
SANTIAGO DE CALI
2021**

**IDENTIFICACIÓN DE VARIANTES GENÓMICAS DEL GEN *GBA* EN
PACIENTES CON PATOLOGÍAS DIFERENTES Y NO DIAGNOSTICADOS
CLINICAMENTE CON ENFERMEDAD DE GAUCHER EN EL
SUROCCIDENTE COLOMBIANO**

**DANIELA ARTURO TERRANOVA
BIÓLOGA**

**Trabajo de grado como requisito para optar al título de:
MAESTRIA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS CON ENFASIS EN BIOLOGÍA
MOLECULAR**

Director

JOSÉ MARÍA SATIZÁBAL SOTO M.D, MSc, PhD.

Co- Director

LINA JOHANNA MORENO GIRALDO M.D, Esp., MSc, PhD(c)

**UNIVERSIDAD DEL VALLE
FACULTAD DE SALUD
ESCUELA DE CIENCIAS BÁSICAS
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FISIOLÓGICAS
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS - 7670
SANTIAGO DE CALI
2021**

NOTA DE ACEPTACIÓN

Presidente del Jurado

Jurado

Jurado

Santiago de Cali, _____

CONTENIDO

RESUMEN	8
ABSTRACT	9
1 INTRODUCCIÓN.....	10
2. JUSTIFICACIÓN	12
3. OBJETIVOS.....	18
3.1 OBJETIVO GENERAL.....	18
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
4. MARCO TEÓRICO	19
4.1 EL GEN <i>GBA</i> Y LA ENZIMA B-GLUCOSIDADA ÁCIDA.....	19
4.2 ENFERMEDAD DE GAUCHER.....	23
4.3 BIOLOGÍA MOLECULAR DEL GEN <i>GBA</i>	27
4.3.1 VARIANTES ASOCIADAS A EG1.....	29
4.3.2 VARIANTES ASOCIADAS A EG2.....	30
4.3.3 VARIANTES ASOCIADAS A EG3.....	30
4.4. MANIFESTACIONES CLÍNICAS.....	31
4.5. DIAGNÓSTICO.....	34
4.6. TRATAMIENTO.....	35
5. METODOLOGÍA.....	44
5.1 TIPO DE ESTUDIO	44
5.2 DATOS DE ESTUDIO	44
5.3 ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO	45
5.4 CÁLCULO DE FRECUENCIAS GÉNICAS Y ALÉLICAS	58
5.2 RED DE INTERACCIÓN DE GENES ASOCIADOS A <i>GBA</i>	58
6. CONSIDERACIONES ÉTICAS.....	59
7. RESULTADOS.....	64
8. DISCUSIÓN.....	75
9. CONCLUSIÓN	85
10. PERSPECTIVAS.....	86
11. CONFLICTO DE INTERÉS Y FINANCIACIÓN.....	86
12. AGRADECIMIENTOS.....	86
10. REFERENCIAS.....	87
11. ANEXOS.....	105

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1. Ubicación cromosómica del gen <i>GBA</i>	20
Figura 2. Representación tridimensional de la enzima β -glucocerebrosidasa	21
Figura 3. Hidrólisis de glucosilceramida por la enzima glucocerebrosidasa (GCasa) en el lisosoma	22
Figura 4. Porcentaje de cambios transicionales y transversionales encontrados en el gen <i>GBA</i> en pacientes con patologías diferentes y no diagnosticados con EG	65
Figura 5. Tipos y cantidades de variantes encontradas en el gen <i>GBA</i> en 320 exomas de pacientes del suroccidente de Colombia	65
Figura 6. Red de interacción entre el gen <i>GBA</i> y genes asociados , generado con el programa GeneMania	72
Figura 7. Esquema de la red de interacción génica asociada al gen <i>GBA</i> con el programa STICHT 5	74

LISTADO DE TABLAS

<u>Tabla 1.</u> Subtipos de la Enfermedad de Gaucher y sus características.....	26
<u>Tabla 2.</u> Bases de datos de poblaciones, enfermedades específicas y secuencias usadas para los análisis bioinformáticos.....	50
<u>Tabla 3.</u> Variantes del gen <i>GBA</i> en 320 pacientes del suroccidente Colombiano.....	68
<u>Tabla 4.</u> Relación de frecuencias alélicas encontradas en variantes patogénicas del gen <i>GBA</i> en 320 exomas y bases de datos poblacionales.....	70

ABREVIATURAS

Término	Abreviatura
American College of Medical Genetics and Genomics	ACMG
Asociación Colombiana de Pacientes con Enfermedades de Depósito Lisosomal	ACOPEL
Alzheimer's Disease Research Center	ADRC
Beta glucosidada Ácida	GBA
Células de Gaucher	CG
Clasificación internacional de enfermedades	CIE
Enfermedad de Gaucher	EG
Enfermedades de Depósito lisosomal	EDL
Enfermedades Huérfanas	EH
Error innato del metabolismo	EIM
Enfermedad de Gaucher tipo 1	EG1
Enfermedad de Gaucher tipo 2	EG2
Enfermedad de Gaucher tipo 3	EG3
Enfermedad de Parkinson	EP
Human Gene Mutation Database	HGMD
Instituto Nacional de Salud	INS
Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos	Invima
Judíos Ashkenazi	AJ
Mendelian Inheritance in Man	MIM
Nacidos Vivos	nv
National Center for Biotechnology Information	NCBI
Retículo endoplasmático	RE
Sistema de Vigilancia en Salud Pública	SIVIGILA
Sistema integrado de información de la protección social	SISPRO
Sistema Nervioso Central	SNC
Terapia Farmacológica de Chaperones	TFC
Terapia de Reemplazo Enzimático	TRE
Terapia de Reducción de Sustrato	TRS
Trasplante de Médula Ósea	TMO

RESUMEN

La Enfermedad de Gaucher (EG) es un trastorno genético autosómico recesivo, causado por la deficiencia de la enzima lisosomal B-Glucocerebrosidasa ácida (*GBA*). En Colombia se ha estimado una prevalencia de 1:266.441 habitantes. Sin embargo, el país no cuenta con datos exactos sobre frecuencia de variantes asociadas con la enfermedad. Con el objetivo de identificar las variantes del gen *GBA*, se realizó un estudio transversal, descriptivo, no experimental, con los resultados obtenidos de la secuenciación del exoma completo de 320 pacientes con patologías diferentes y sin sospecha clínica de EG. Se utilizaron softwares bioinformáticos para analizar la importancia clínica de las diferentes variantes. Se calculó la frecuencia poblacional de cada uno y se desarrolló una red de interacción del gen *GBA*. Como resultados, se encontraron 41 variantes asociadas al gen *GBA*; 21 de las variantes reportadas presentaron una significancia clínica benigna, 5 obtuvieron una clasificación patogénica o probablemente patogénica, con frecuencias que oscilaron entre 0,0062 y 0,0218 y 7 presentaron una significancia incierta. La variante más frecuente fue c.454+47G>A encontrándose en un 90% de las muestras con una significancia clínica benigna. 2 de las 5 variantes patogénicas se encontraron reportadas en asociación con enfermedad de Parkinson. La red de interacción de genes permitió observar asociaciones cercanas entre *GBA* y los genes *PSAP*, *SCARB2*, *LAMP2*, todos ellos asociados a funciones de localizaciones vacuolares, instrucciones de lumen lisosomal y vacuolar, membranas vacuolares y lisosomales. Nuestros resultados destacan el hecho de que el impacto en el fenotipo depende en gran medida de la patogenicidad de las variantes, por tal motivo es fundamental realizar estudios genómicos-bioinformáticos que permitan ampliar estos conocimientos. Además sugieren que las variantes en el gen *GBA*, incluso en individuos heterocigotos, podrían ser un factor de riesgo heredado para el desarrollo de parkinsonismo.

Palabras Claves: Biología computacional, Enfermedad de Gaucher, Enfermedades de Depósito Lisosomal, Glucosilceramida, Secuenciación del Exoma Completo (DeCS).

ABSTRACT

Gaucher Disease (GD) is an autosomal recessive genetic disorder, caused by a deficiency of the enzyme B-Glucocerebrosidase (*GBA*). In Colombia, a prevalence of 1: 266,441 inhabitants has been estimated. However, the country does not have exact data on the frequency of variants associated with the disease. To identify the variants of the *GBA* gene, a transversal, descriptive, non-experimental study was carried out with the results obtained from the sequencing of the complete exome of 320 patients with complex disease, without clinical suspicion of GD. Bioinformatic software were used to analyze the clinical significance of the different variants. The population frequency of each one was calculated, and it was developed a network of interaction of the *GBA* gene. As a result, 41 variants associated to the *GBA* gene were found; 21/41 of the variants reported represented a benign significance, 5/41 of the variants reported obtained a classification of pathogenic or probably pathogenic with frequencies ranging from 0.0062 to 0.0218 and 7/41 of the variants reported presented uncertain significance. The most frequent variant was c.454 + 47G> A, found in 90% of the samples with benign clinical significance. 2/5 pathogenic variants were reported in association with Parkinson's disease. The gene interaction network allowed observing close associations between *GBA* and *PSAP*, *SCARB2*, *LAMP2* genes, all of them focused on functions of vacuolar locations, lysosomal and vacuolar lumen instructions, vacuolar and lysosomal membranes. Our results highlight the fact that the impact on the phenotype depends to a large extent on the pathogenicity of the variants, for this reason it is essential to carry out genomic-bioinformatic studies to expand this knowledge. They also suggest that mutations in the *GBA* gene, even in heterozygous individuals, could be an inherited risk factor for the development of parkinsonism.

KeyWords: Computational Biology, Gaucher Disease, Glucosylceramidase, Lysosomal Storage Diseases, Whole Exome Sequencing (DeCS).

1. INTRODUCCIÓN

La Enfermedad de Gaucher (EG) (MIM # 230800, 230900, 231000; CIE-10 E75.2; ORPHA: 355) es un desorden lisosomal, hereditario del tipo autosómico recesivo, causado por una mutación en el gen *GBA*, localizado en la región q21 del cromosoma 1. Esta enfermedad es caracterizada por una deficiencia parcial o total, de la enzima beta glucocerebrosidasa (β -glucosidasa ácida) la cual es necesaria para degradar un tipo de lípido conocido como glucosilceramida, que, como consecuencia del déficit enzimático, se acumula en el cuerpo, predominantemente en el hígado, el bazo y la médula ósea (1,2).

La EG es el desorden lisosomal más frecuente, con una prevalencia de aproximadamente 1/40,000. En la población judía Ashkenazi (AJ), la prevalencia fué históricamente tan alta como 1/1,000 (3). Estudios realizados por Nalysnyk *et al* (2017) encontraron que la estimación de la incidencia al nacer, en comunidades con ancestros mixtos, varía entre 1 caso por cada 17.421 nacidos vivos (nv) en Austria, y hasta 1 caso por cada 256.410 nv en Canadá (4). Orphanet reporta una prevalencia en Europa de alrededor de 1 caso por cada 100.000 habitantes (5). En Colombia, de acuerdo con la Asociación Colombiana de Pacientes con Enfermedades de Depósito Lisosomal -ACOPEL, se estima una prevalencia de 1 por cada 266.441 habitantes (6). Sin embargo, a pesar de que la EG se encuentra dentro del listado de las 2.198 Enfermedades Huérfanas (EH) en el país según Resolución 5265 del 2018, aún no se cuenta con cifras exactas sobre la incidencia y prevalencia de esta enfermedad, ya que, por desconocimiento, heterogeneidad clínica y/o difícil diagnóstico, es una enfermedad subdiagnosticada en Colombia.

Existen más de 460 variantes en el gen *GBA*, Sin embargo, cuatro variantes comunes - N370S, IVS2, 84GG, L444P son responsables de aproximadamente el 96,5% de la EG en la población AJ, en el hemisferio occidental y de aproximadamente el 50% -60% en las poblaciones no judías (1).

La baja expresión del gen *GBA*, determina las manifestaciones clínicas heterogéneas de la enfermedad (1)(2). Actualmente la EG se clasifica en 3 tipos

básicos dependiendo de la presencia y gravedad del compromiso neurológico. La EG tipo 1 (EG1) es la más frecuente y se caracteriza por su extrema heterogeneidad, que incluye presentaciones asintomáticas o más graves. se distingue por la ausencia de compromiso neurológico primario. La acumulación de glucosilceramida en órganos viscerales genera, en el 90% de los pacientes, esplenomegalia y, entre el 60-80% de los afectados con la enfermedad, hepatomegalia. Como consecuencia de esto, resulta frecuente la disminución de la concentración de glóbulos rojos y trombocitopenia. Así mismo, alrededor del 50% de los pacientes sufren de fatiga crónica lo que muchas veces impacta su actividad diaria y sus actividades socio-profesionales (7). Por su parte, la EG2 y EG3 se asocian con afectación neurológica que pueden llegar a ser graves.

Tradicionalmente, el diagnóstico se ha realizado mediante un examen clínico acompañado del estudio bioquímico midiendo los niveles de la actividad de la enzima B-Glucocerebrosidasa en los leucocitos de sangre periférica (8). Sin embargo, los estudios enzimáticos no permiten la distinción entre los individuos sanos y los portadores heterocigotos; es por esta razón que hoy en día se está realizando el análisis de variantes específicas del gen de interés o adoptando el uso de técnicas moleculares como la secuenciación del exoma completo para efectos de asociaciones fenotipo-genotipo y un conocimiento más amplio sobre las variantes asociadas a la enfermedad (8,9). En cuanto al tratamiento, hoy en día se encuentran disponibles abordajes terapéuticos como la terapia de reemplazo enzimático, la terapia farmacológica de chaperonas, el trasplante de médula ósea, el uso de oligonucleótidos anti sentido y la terapia génica experimental (1,3).

De esta forma, el presente estudio busca ampliar el conocimiento sobre esta patología, mediante la revisión exhaustiva de literatura asociada a las variantes reportadas de la EG y el uso de herramientas genómicas y bioinformáticas que permitan encontrar variantes asociadas al gen *GBA* en una población con patologías diferentes y no diagnosticados clínicamente con EG del suroccidente Colombiano.

2. JUSTIFICACIÓN

La EG es la enfermedad de almacenamiento lisosomal más prevalente. La EG1 es la más frecuente en los Estados Unidos, Europa e Israel y ocurre con mayor frecuencia en la población AJ. Se reportaron aproximadamente 20,000 individuos con EG en los Estados Unidos a mediados de la década de 1990, según un estudio de frecuencia de genes, 2/3 de los cuales eran AJ (4,10,11). Una encuesta posterior estimó que la incidencia estandarizada de pacientes nacidos con EG en la población general era entre 0.4 y 5.8 por 100,000, con una prevalencia de 0.7 a 1.8 por 100,000 (4).

La EG1 es el tipo más comúnmente visto en la población AJ, aunque la mayoría de los pacientes no son judíos. La frecuencia de portadores en los AJ es de aproximadamente 1 en 12 (12), y la frecuencia de los genotipos asociados a la enfermedad se calcula en 1 en 850 (13). La incidencia de EG1 es mucho menor en las poblaciones no judías, y ocurre en aproximadamente 1 de cada 40,000 a 1 en 86,000 nv. Por su parte, se conoce que la EG2 (también llamada EG neuronopática aguda) tiene una incidencia estimada de 1 en 150,000 (14)

La primera publicación colombiana sobre la EG fué realizada por Cadavid en 1925, donde se reportó un paciente con hepatoesplenomegalia con sospecha de la enfermedad y sin confirmación de la misma (15); Echavarría *et al.*, en 1966 informaron dos casos, uno de ellos de EG1 (16) y en 1970 Rodríguez *et al.*, presentaron tres casos de la forma grave (17). De esta manera, para 1972 se conocían 12 casos en total reportados en literatura para el país (18). En el 2006 se habían reportado 76 casos de EG, de los cuales 55 se encontraban registrados en la plataforma *ClinicalTrials.gov* (19); de éstos, 29 eran adultos (53%) y 26 niños (47%). 50 pacientes del tipo I y 5 del tipo II y III. En el mismo año, Lozano-Bernal describió el historial clínico de la casuística del departamento de Tolima en referencia a esta patología, ilustró cuatro casos diagnosticados en los últimos 10 años, el primero de los cuales se diagnosticó el 28 de noviembre de 1996 y el último el 9 de febrero de 2005 (20). Para el año 2013, un trabajo realizado por Uribe *et al.*, reportó que en Colombia se les había realizado prueba de medición de actividad enzimática a 9112 personas con

sospecha de enfermedad de depósito lisosomal (EDL), de las cuales 117 se diagnosticaron con EG (21).

De acuerdo con ACOPEL, para el 2014, se tenían 139 personas que habían sido diagnosticadas con EG (22) y para el 2017 este número ascendía a 185, lo que equivale a una prevalencia puntual de 1 por cada 266.441 habitantes (6).

Sin embargo, los datos del Instituto Nacional de Salud (INS) de Colombia, quien realiza anualmente el informe de seguimiento a las EH-raras, y tiene como fuente de información la notificación al Sistema de Vigilancia en Salud Pública – SIVIGILA y el Sistema Integral de Información de la Protección Social (SISPRO), reportaron que durante 2016- 2017 y hasta la semana 24 del 2018 se tenían 25 casos correspondientes a EG (23), los cuales debían ser sumados a los 68 que se encontraban registrados en el censo de EH-raras (2015). Así, según las fuentes oficiales, en 2018 el número de pacientes registrados con EG en Colombia ascendían a 93 (6) (23). Adicionalmente, en el boletín epidemiológico semanal del INS para la Semana 05 (27 de enero- 2 de febrero de 2019) no se habían reportado casos confirmados de EG en Colombia (24). Esto deja ver un panorama en Colombia que no es claro en cuanto a frecuencia de la enfermedad, además no se tienen estudios epidemiológicos a gran escala que permitan profundizar en el conocimiento y acercamiento del número de afectados en el país.

A pesar de lo anterior, los avances en este tema se han venido realizando desde el año 2010, mediante la Ley No 1392 donde “Se reconocen las EH como de especial interés y se adoptan normas tendientes a garantizar la protección social por parte del estado colombiano a la población que padece de ellas y sus cuidadores” (25), posteriormente, se expide el decreto 1954 de 2012 para implementar el sistema de información de pacientes con EH, definidas en la Ley 1392 de 2010, con el fin de “disponer de la información periódica y sistemática que permita realizar el seguimiento de la gestión de las entidades responsables de su atención, evaluar el estado de implementación y desarrollo de la política de atención en salud de quienes las padecen y su impacto en el territorio nacional” (26) . En 2015 y como parte de la política de salud pública en el país,

se implementó el programa de notificación rutinaria para EH, generando una base de datos con la información necesaria sobre los pacientes y su diagnóstico clínico, enzimático y molecular (27). Su funcionamiento empieza correctamente en 2016 en donde para afianzar el Protocolo de Vigilancia de EH– Raras las notificaciones se proponen realizar semanalmente al SIVIGILA con periodicidad bimensual al SISPRO, a partir de los casos confirmados.

De esta manera, hoy en día la EG se encuentra en el listado de las 2.198 EH reportadas en la resolución 5265 del 2018 (#811 Enfermedad de Gaucher CIE-10 : E752, # 812 Enfermedad de Gaucher-oftalmoplejia calcificación cardiovascular CIE-10: E752, # 813 Enfermedad de Gaucher Tipo 1 CIE-10 : E752, # 814 Enfermedad de Gaucher Tipo 2 CIE-10: E752 , # 815 Enfermedad de Gaucher tipo 3 CIE-10: E752), cuyo diagnóstico se hace mediante la actividad de la enzima lisosomal B-glucosidasa ácida y como prueba opcional el estudio molecular del gen *GBA*; lo anterior, permite un manejo adecuado de la información, generando un reporte oportuno y acercamiento a la prevalencia e incidencia de la enfermedad (28).

Una de las problemáticas más grandes para el acercamiento al número correcto de Colombianos afectados por la EG es su diagnóstico, ya que, a pesar de la disponibilidad de pruebas definidas, como el análisis de la actividad enzimática de *GBA* en los leucocitos y/o fibroblastos, y los análisis moleculares del gen *GBA*, los pacientes siguen siendo diagnosticados erróneamente y experimentan retrasos diagnósticos significativos (29,30). Esto es probablemente una consecuencia de la relativa rareza de la enfermedad, la dificultad de los estudios enzimáticos para realizar la distinción entre los individuos sanos y los portadores, el desconocimiento sobre la patología y la heterogeneidad clínica (31); relacionado con las grandes diferencias fenotípicas dentro de los grupos genotípicos y entre individuos con una misma mutación en el gen *GBA*, lo que implica una contribución significativa de otros factores genéticos y no genéticos que modifican su expresión; así mismo, el desconocimiento de las variantes que pueden presentarse en el mismo gen y el nivel de alteración proteica que una variante (o más) puedan ocasionar en un individuo, generan retraso en el diagnóstico y el tratamiento oportuno de la enfermedad (29,31).

A pesar de lo expuesto anteriormente, el interés actual en estudiar enfermedades como la EG se ha ido posicionando como un campo de la investigación biomédica en el que los investigadores usan herramientas genómicas bioinformáticas, como análisis computarizados, para comparar las secuencias genómicas entre individuos, obtener características propias de cada estudio, localizar regiones de similitudes y diferencias; esto, en conjunto permite asociar los resultados de variantes secuenciales en efectos funcionales, permitiendo explicar la etiología de la enfermedad, ayudando a entender la estructura y la función de los genes implicados, generando la creación de nuevas estrategias para tratamientos dirigidos.

Así mismo, dichos estudios bioinformáticos han sido posibles de realizar gracias al avance en técnicas como los estudios de exomas completos, permitiendo un aumento en el conocimiento y el registro de amplia información en diversas enfermedades; es de anotar que esta técnica implica la secuenciación de todas las regiones genómicas codificantes, intrones y sitios de *splicing*, obteniendo de esta manera la máxima información genética posible a lo largo de los 26.000 genes que constituyen el exoma humano. Las variantes pueden ser detectadas en genes relacionados con la historia clínica del paciente o bien en genes cuya relación con la enfermedad no ha sido aún descrita, permitiendo un abordaje más amplio de síndromes complejos. La Secuenciación del Exoma Completo proporciona una cobertura de profundidad media de 100x. Esto permite el estudio detallado de las secuencias codificantes analizadas con máximo rendimiento diagnóstico en la mayoría de las regiones.

Teniendo en cuenta el interés de estudiar EH, nuestro grupo de investigación de la Universidad del Valle: Enfermedades Congénitas del Metabolismo, ha logrado recopilar durante más de 8 años información entorno al conocimiento de la EG, abordando estudios en el Suroccidente Colombiano basados en reconocer la incidencia y prevalencia de la enfermedad, así como analizar las características de las variantes genéticas que se puedan presentar en estos pacientes.

De esta manera, en el año 2015 el grupo de investigación confirmó por primera vez en un paciente recién nacido con fenotipo descrito para Enfermedad de Gaucher tipo II (trombocitopenia, anemia, leucocitosis, hiperbilirrubinemia a expensas de bilirrubina indirecta, elevación de creatinina para la edad, reactantes de fase aguda levemente elevados, hiperglicemia, hipocalcemia; una actividad enzimática de la B-glucocerebrosidasa baja con respecto al valor de referencia: 4,4 $\mu\text{mol/l/h}$ (referencia $\geq 7,9 \mu\text{mol/l/h}$); una concentración del biomarcador lyso-Gb1 normal: 2,9 ng/ml (referencia $\leq 3,5 \text{ ng/ml}$); y detección de una mutación heterocigótica en el exón-8 del gen *GBA* (c.1200G >A p.M400I), analizado por PCR con una referencia de secuencia: NM_000157.3. Este hallazgo permitió comprender que las grandes diferencias fenotípicas dentro de los grupos genotípicos y entre individuos con la misma mutación, implican una contribución significativa de otros factores genéticos y no genéticos que modifican su expresión. Además, permitió plantear en cuadros clínicos debidos a variantes en estado heterocigótico, el paradigma de un comportamiento con mecanismo de herencia dominante o la presencia de otras alteraciones en el gen, requiriendo de mayores investigaciones bioquímicas y moleculares para la correlación genotipo-fenotípico y un asesoramiento genético adecuado. (32). Este trabajo permitió al grupo, obtener el galardón de primer puesto de investigación en el “Recent Advances in Rare Diseases – RARD”, realizado en Moscú, Rusia, un evento de talla mundial que reunió a más de 300 profesionales y expertos en enfermedades raras (33).

Así mismo, en el LIV Congreso Nacional y V internacional de ciencias Biológicas, llevado a cabo en Montería- Córdoba. Colombia (2019) el grupo de investigación presentó los resultados de un Big Data de 135 exomas completos analizados en donde se encontraron un total de 24 variantes para el gen *GBA*; de estas, 14 no se encontraron reportadas anteriormente y 1 se asoció con un significado clínico patogénico. La variante p.Lys13Arg fué encontrada con una alta frecuencia en las muestras (54%). De igual manera, la determinación de casos esperados por Frecuencia Alélica, indicó 1.345 casos y la estimación de casos esperados por frecuencia poblacional arrojó un resultado de 500 casos en la población nacional, resultando esta información útil para los estimativos de frecuencia en el país, y generando una actualización del panorama y epidemiología de EG (34).

De esta manera, la identificación oportuna de variantes en el gen *GBA* asociado con EG, permite profundizar en el conocimiento de las diferentes expresiones fenotipo – genotipo, la predicción de la significancia clínica de las variantes mediante el uso de herramientas genómicas y bioinformáticas para el estudio de portadores homocigotos y heterocigotos, sumado al estudio de posibles dianas terapéuticas dirigidas y personalizadas.

Teniendo en cuenta que la información conocida sobre esta patología sigue siendo escasa en nuestro país, las investigaciones sobre la EG aportan al conocimiento de esta enfermedad y ofrecen un apoyo desde lo científico al manejo oportuno de las EH; por tanto, este trabajo busca identificar las variantes del gen *GBA*, así como fortalecer los datos existentes en cuanto a las variantes asociadas a la enfermedad en pacientes del suroccidente colombiano sin sospecha clínica de EG.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Identificar las variantes genómicas del gen *GBA* encontradas en pacientes con patologías diferentes y no diagnosticados clínicamente con Enfermedad de Gaucher del Suroccidente Colombiano.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar las variantes genómicas encontradas en una población del suroccidente colombiano con patologías diferentes y no diagnosticados clínicamente con Enfermedad de Gaucher
2. Caracterizar las variantes genómicas del gen *GBA* encontradas en una población del suroccidente colombiano con patologías diferentes y no diagnosticados clínicamente con Enfermedad de Gaucher, de acuerdo con el ACMG.
3. Calcular la frecuencia alélica de las variantes en el gen *GBA* en pacientes del suroccidente colombiano, con patologías diferentes, sin sospecha clínica de enfermedad de Gaucher
4. Predecir Interacciones entre el gen *GBA* y otros genes-moléculas pequeñas que modulen su expresión.
5. Sugerir lineamientos de políticas públicas para la instauración de programas de diagnóstico temprano, tamizaje, tratamiento específico y oportuno, manejo transdisciplinario que minimice la morbilidad y mortalidad atribuida a la enfermedad, acercándonos a la medicina de precisión.

4. MARCO TEÓRICO

Las Enfermedades de Depósito Lisosomal (EDL) se producen por el déficit de enzimas específicas intralisosomales o del sistema de proteínas transportadoras, del núcleo al citoplasma, encargadas de la hidrólisis ácida de macromoléculas situadas en el interior de los lisosomas. Este defecto enzimático produce un acúmulo progresivo del sustrato correspondiente en diferentes tejidos, lo que lleva a una enfermedad crónica y multiorgánica. Las variantes patogénicas en el gen *GBA* conducen a la acumulación de sustratos, lo que resulta en el Error Innato del Metabolismo (EIM) que afecta el reciclaje de los glucolípidos celulares, llamado Enfermedad de Gaucher (EG) (35).

La EG es una enfermedad heterogénea, que exhibe diversas manifestaciones, amplio intervalo de edad de inicio de los síntomas y amplio espectro de la severidad de la enfermedad, desde una forma letal en la infancia hasta inicio de síntomas en la edad adulta. Fué descrita por primera vez, en 1882, por el dermatólogo francés Phillipe Charles Gaucher quién describió el caso de una mujer de 32 años con esplenomegalia masiva y células inusualmente grandes en el bazo, que denominó “epitelioma primario de bazo” (36,37). Posteriormente, el término EG lo introdujo Mendelbaum en 1912, que amplió la descripción de patología anatómica y morfológica de la enfermedad (38).

En 1965, las investigaciones de Brady demostraron que la EG estaba producida por el déficit de la enzima lisosómica beta-glucosidasa ácida o cerebrosidasa, responsable de la hidrólisis intracelular de la glucosilceramida y otros esfingolípidos afines (39). Este déficit enzimático provoca la acumulación de estos lípidos en los lisosomas del sistema retículoendotelial. En 1948 Groen, fué el primero en describir la transmisión genética de la enfermedad, sugiriendo que era una enfermedad autosómica recesiva (40).

4.1 EL GEN *GBA* Y LA ENZIMA B-GLUCOSIDASA ÁCIDA

El gen *GBA* se encuentra localizado en el cromosoma 1, región q21-31 (Figura 1). Contiene 10 exones y 11 intrones que abarcan 7,5kb, codifica una proteína

de 497 aminoácidos con un peso molecular de 55,5 KDa. Está ubicado dentro de un locus complejo que contiene 7 genes y 2 pseudogenes, probablemente procedentes de un evento de duplicación de esta región cromosómica. De hecho, un pseudogén altamente homólogo de 5.7 kb (*GBAP1*) se encuentra aproximadamente a 16 kb del gen funcional *GBA* (41). La región exónica del *GBAP1* comparte el 96% de homología de secuencia con la región de codificación del gen *GBA*, mientras que la secuencia de homología alcanza el 98% en la región entre el intrón 8 y las 30 regiones no traducidas. *GBAP1* es más corto que *GBA*, falta varias inserciones de Alu en trectos intrónicos y llevar un 55-bp deleción en el exón 92. La alta homología y la proximidad física entre *GBAP1* y *GBA* permite ambos recombinación homóloga no recíproca y eventos recíprocos resultando en reordenamientos pseudogénicos complejos (42).

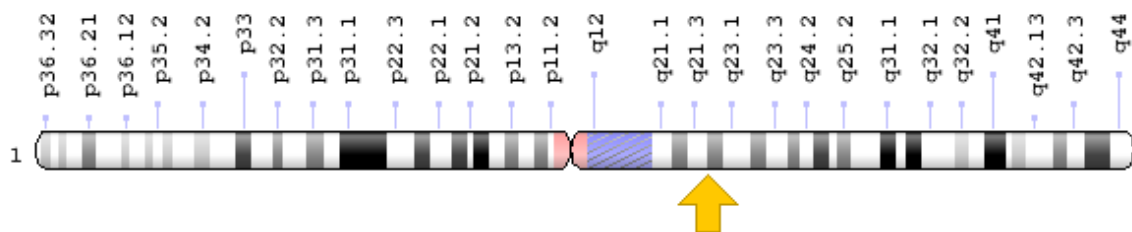


Figura 1. Ubicación cromosómica del gen *GBA*
[Fuente: Genetic Home Reference 2018] (41).

Este gen proporciona instrucciones para producir la enzima β -glucocerebrosidasa, un miembro de la familia de las glucósidos hidrolasas 30 (enzimas que hidrolizan el enlace glucosídico entre dos o más carbohidratos). La enzima consta de 3 dominios, el dominio I (residuos 1–27 y 383–414) que contiene dos puentes disulfuro necesarios para el plegamiento correcto, así como un residuo glicosilado (Asn19) requerido para la actividad catalítica in vivo (43). El dominio II (residuos 30-75 y 431-497) que consta de dos láminas β que se asemejan a un pliegue de inmunoglobulina y el dominio III (residuos 76–381 y 416–430) homólogo a un barril TIM, dominio altamente conservado entre los glucósidos hidrolasas que alberga el sitio activo, que se une al sustrato glucocerebrósido (43,44) (Figura 2). Las proteínas producidas como consecuencia de variantes patogénicas en el gen *GBA* tienen una estructura

defectuosa, lo que se traduce en un mal plegamiento tridimensional de la molécula (45).

El proceso del plegamiento de la proteína es complejo y depende sus propiedades biofísicas; se modifica por la temperatura y las condiciones del microambiente (45) Los pliegues de la molécula pueden configurarse de múltiples formas. Muchas de las proteínas mal plegadas son producto de una o más variantes patogénicas . El plegamiento defectuoso también está provocado por el acúmulo intracelular de proteína, lo que dificulta la conformación correcta por colisiones de alta energía con las otras proteínas; este proceso produce ganancia de energía y dificulta el tráfico intracelular (46,47).

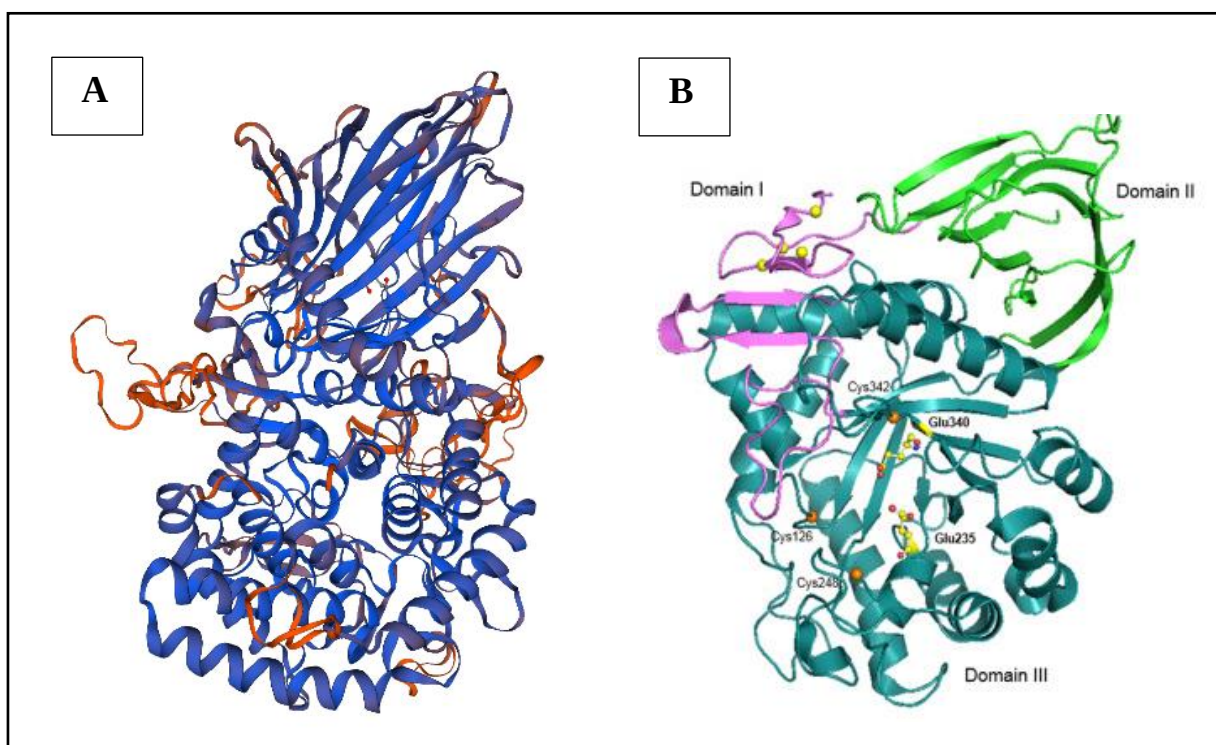


Figura 2. A) Representación tridimensional la enzima β -glucocerebrosidasa usando SWISS-MODEL [Fuente : Elaboración propia] B) El dominio I es de color rosa, con los átomos de azufre involucrados en los puentes disulfuro etiquetados como esferas amarillas. El dominio II es de color verde. El dominio III es de color verde azul turquí; esta segunda representación se realizó utilizando PYMOL (<http://www.pymol.org>) [Fuente: Smith *et al*, 2017] (48).

La enzima β -glucocerebrosidasa está activa en los lisosomas; estos lisosomas usan enzimas líticas para descomponer sustancias tóxicas, digerir las bacterias que invaden la célula y reciclar los componentes celulares desgastados. La beta-glucocerebrosidasa ayuda a descomponer glucocerebrosidos en glucosa y ceramida. En individuos sanos, la beta-glucocerebrosidasa descompone la glucosilceramida, un glucolípido proveniente de la membrana de los eritrocitos y leucocitos desgastados, en los lisosomas de los monocitos y macrófagos. En individuos con EG esta descomposición es insuficiente, provocando la acumulación de sustrato en los monocitos y macrófagos. Estas células repletas de lípidos se denominan “Células de Gaucher” (CG) y tienen una apariencia característica con aumento considerable de su tamaño y supervivencia (Figura 3). Se acumulan de forma progresiva y en grandes cantidades en los órganos y tejidos donde se encuentran normalmente los macrófagos, lo que explica la naturaleza multisistémica de los signos y síntomas (49).

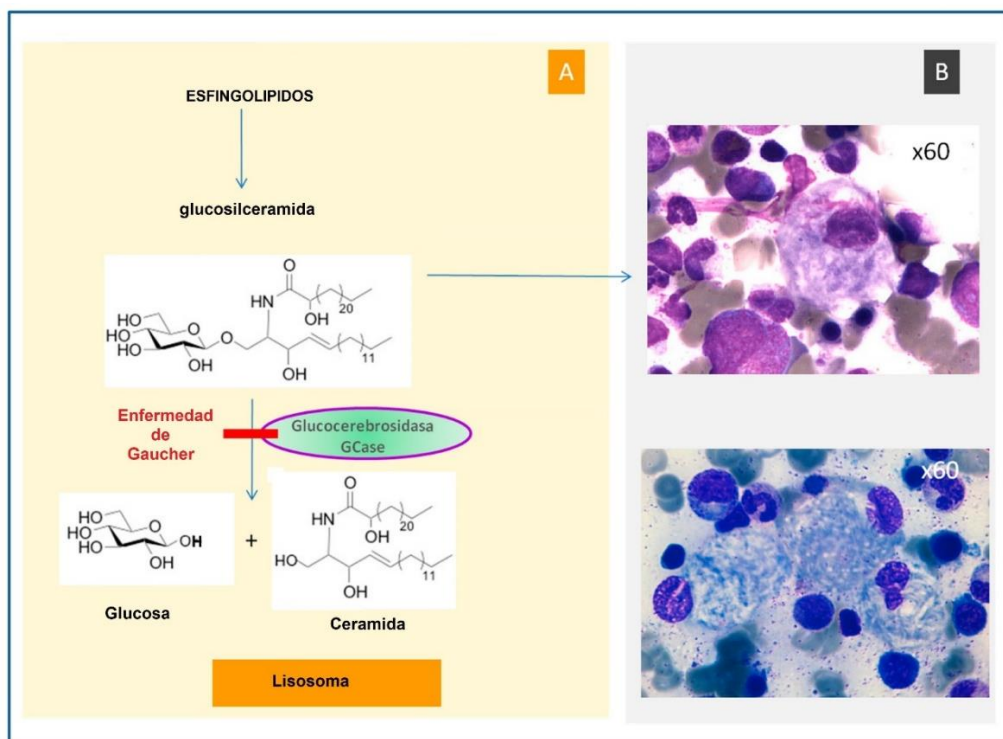


Figura 3. Hidrólisis de glucosilceramida por la enzima glucocerebrosidasa (GCasa) en el lisosoma (A) La EG es causada por una deficiencia de glucocerebrosidasa, lo que conduce a una acumulación de glucosa y ceramida, formando agregados fibrilares que se acumulan en los macrófagos y dan como resultado que el citoplasma celular presente una apariencia característica de "papel de seda arrugado" (B) [Fué nte: Adaptado de Stirnemann *et al*, 2017]

4.2 LA ENFERMEDAD DE GAUCHER

La EG es un trastorno de almacenamiento lisosómico causado por variantes en el gen GBA de la glucocerebrosidasa, que conduce a una patología multiorgánica; abarca un continuo de hallazgos clínicos desde un trastorno perinatal letal hasta un tipo asintomático. La identificación de tres tipos clínicos principales es útil para determinar el pronóstico y el manejo (Tabla 1).

- ✓ La Enfermedad de Gaucher No Neuropática tipo 1 o Adulta (EG1) (MIM: 230800) es la forma más común y se caracteriza generalmente por la ausencia de deterioro neurológico, es la forma más común de la enfermedad (prevalencia: 90% –95% en Europa y América del Norte). Tiene una presentación clínica variable, desde asintomática a lo largo de la vida, hasta formas de presentación temprana. Generalmente presenta evidencia clínica o radiográfica de enfermedad ósea (osteopenia, lesiones líticas o escleróticas focales y osteonecrosis), hepatoesplenomegalia, anemia y trombocitopenia, enfermedad pulmonar y ausencia de enfermedad primaria del sistema nervioso central. Así mismo, alrededor del 50% de los pacientes sufren de fatiga crónica lo que muchas veces impacta fuertemente su vida (1, 49) La EG1 a menudo puede limitar la calidad de vida y se ha asociado con una considerable morbilidad, pero rara vez es mortal. La EG1 se caracteriza por la ausencia de implicación del SNC, sin embargo algunos pacientes desarrollan síntomas neurológicos, como Enfermedad de Parkinson, enfermedad de cuerpos de Lewy, epilepsia mioclónica y polineuropatía periférica entre otros (1,2,49).

Se ha reportado que la edad media de diagnóstico de EG1 es de 10 a 20 años. Aunque el inicio medio general de pacientes en el Registro de Gaucher (administrado por International Collaborative Gaucher Group) ha sido reportado a los 20,4 años, la mayoría (56%) de los pacientes experimentaron aparición de signos y síntomas antes de los 20 años (50,51).

- ✓ La Enfermedad de Gaucher Neuropática Infantil Aguda tipo 2 (EG2) (MIM : 230900) representa la forma menos frecuente (menos del 5% de los

casos). Se presenta en el período neonatal con hepato-esplenomegalia y afectación neurológica progresiva y discapacidad, básicamente de las funciones del tallo cerebral, como hipertonía progresiva, estrabismo y retroflexión de la cabeza, que conduce a la muerte en los primeros años de vida. Estudios realizados por Van Rossum *et al.*, (2016) reportan parálisis supranuclear progresiva con deterioro y muerte gradual de ciertas áreas del cerebro (52,53).

- ✓ La Enfermedad de Gaucher Neuropática Crónica tipo 3 o Infantil (EG3) (MIM: 231000) es de gravedad intermedia entre los tipos 1 y 2, y se presenta en la infancia o en la edad adulta temprana con afectación neurológica y hepática que puede ser progresiva. (53) Este subtipo a su vez se ha clasificado también : el tipo 3a presenta demencia progresiva, ataxia y mioclonías; el tipo 3b presenta compromiso visceral y óseo extensivo, mientras que el compromiso del Sistema Nervioso Central (SNC) se limita o bien a parálisis supranuclear progresiva o a algún síndrome neurodegenerativo de progreso más lento y por último el tipo 3c, o forma cardiovascular, es todavía más rara, no genera compromiso visceral y genera parálisis supranuclear progresiva, opacidad córnea y calcificación cardiovascular (54). Se ha reportado afectación valvular del lado izquierdo en forma de esclerosis y calcificación que conduce a estenosis o regurgitación. Los pacientes jóvenes con calcificación valvular y subvalvular grave deben ser evaluados con mucha precaución ya que en ocasiones la calcificación grave se extiende a los ostios coronarios, la aorta ascendente e incluso se extiende a la aorta abdominal, formando así la llamada aorta de porcelana (53,54).

Adicionalmente, diversas investigaciones han propuesto otros dos subtipos relacionados con EG: perinatal-letal y cardiovascular.

- ✓ La forma neonatal-letal (MIM: 608013) se asocia con anomalías cutáneas ictiosiformes o de colodión, con hidropesía fetal no inmune. Cuando no hay hidropesía, la afectación neurológica comienza en la primera semana y conduce a la muerte en tres meses. La hepatoesplenomegalia es un signo importante y se asocia con ictiosis, artrogriposis y dismorfia facial en aproximadamente el 35-43% de los casos (55). La EG neonatal-letal es

una entidad específica definida por su curso particular y signos que están ausentes en la enfermedad de Gaucher tipo 2 clásica.

- ✓ La forma cardiovascular se caracteriza por calcificación de las válvulas aórtica y mitral, esplenomegalia leve, opacidades corneales y oftalmoplejía supranuclear. Además, se han descrito complicaciones cardiopulmonares con todos los subtipos clínicos, aunque varían en frecuencia y gravedad (56).

Subtipo	Tipo 1		Tipo 2		Tipo 3		
	Sintomático	Asintomático	Infantil	Neonatal	3a	3b	3c
Genotipo común	N370S / otras variantes leves	N370S/N370S u otras 2 variantes leves	1 variante nula y 1 variante severa	2 variantes nulas o recombinantes	D409H/D409H	L444p/L444P	Ninguna
Características	Hepatoesplenomegalia	Ninguno	Parálisis de la mirada	Ictiosis congénita	Parálisis de la mirada	Parálisis de la mirada	Parálisis de la mirada
	Hiperesplenismo		Estrabismo		Calcificación en válvulas cardíacas	Hepatoesplanomegalia	convulsiones mioclónicas
	Sangrado		Trismus severo			retardo en el crecimiento	
	Dolor en los huesos						
SNC	Ninguno	Parkinsonismo?	Severo	Letal	parálisis de la mirada Braquicefalea	Parálisis de la mirada Deterioro cognitivo gradual	Parálisis de la mirada Deterioro neurológico progresivo.
Huesos	Medio a severo	No	No	No	Mínimo	Moderado a severo	Medio
Pulmones	No (Raramente)	No	Severo	Severo	Mínimo	Moderado a severo	Medio a moderado
Expectativa de vida	Normal	Normal	Muerte antes de los 2 años	Muerte neonatal	Muerte cercana a la adultez	Muerte a mediados de la edad adulta	Muerte durante la niñez
Tratamiento	TRE*	No	Paliativo	No	Reemplazo de válvulas	TRE*	TRE*

Tabla 1. Subtipos de la enfermedad de Gaucher [Adaptado de : Van Rossum *et al.*, 2016] (53)

4.3 BIOLOGÍA MOLECULAR DEL GEN *GBA*

Las variantes descritas en las diversas poblaciones estudiadas en el mundo parecen indicar una región en el gen *GBA* donde se concentra la mayor cantidad de variantes. Esa región se localiza entre los exones 8 y 10 del gen (57,58). Según la Base de Datos de Mutaciones del Genoma Humano (HGMD), a la fecha se han reportado 460 variantes en el gen *GBA*, entre las que se incluyen sustituciones sin sentido, pequeñas inserciones o deleciones que conducen a cambios del marco de lecturas o alteraciones en el marco de lectura y afectación del sitio de splicing (59,60).

De todas las variantes descritas en *GBA*, sólo unas 120 se han asociado a fenotipos de EG; aproximadamente 40 al tipo 1, 35 al tipo 2 y 8 al tipo 3 (59), sin establecerse alguna región génica o dominio donde ocurran de manera preferencial y la distribución étnica y geográfica de cada mutación pueden variar significativamente (61,62).

Aproximadamente el 70% de todas las sustituciones informadas, incluidas las dos sustituciones patogénicas más comunes, p. N370S y p. L444P, se encuentran en los exones 9-10 del gen *GBA* (63)

Las diferentes variantes pueden estar más representadas en grupos étnicos particulares, así como en fenotipos particulares. La primera variante reportada en EG fué p. Leu483Pro (64). La más común identificada en los pacientes rumanos es p. Asn409Ser (65). La más común entre los pacientes AJ es c.1226A <G (N370S; o N409S según la nueva nomenclatura) seguida de c.84dupG (84GG), que es más rara (66). El cambio c.115 + 1G> A (IVS2 + 1), c.1504C> T (R463C) y c.1604G> A (R496H) se encuentran comúnmente en pacientes AJ con EG1. Por el contrario, la mutación N370S rara vez se encuentra entre pacientes chinos y japoneses. (59).

Entre los grupos étnicos asiáticos, el c.1448T> C (L444P o L483P según la nueva nomenclatura) y el c.754T> A (F252I), generalmente asociado con EG2 y 3, son más prevalentes, y también explican por qué entre estas poblaciones, las

formas neuropáticas de EG son más frecuentes (56). La variante c.1448T> C (L444P) es también la mutación más frecuente entre los caucásicos con ascendencia judía no Ashkenazi (67).

Se han encontrado que las diferentes variantes pueden conducir a diferentes fenotipos de EG. La variante N370S está asociada solo con la EG1 y parece ser protectora para el desarrollo de la afectación neurológica característica de EG2 y EG3. Los pacientes que son homocigotos para la variante N370S también pueden permanecer asintomáticos para la enfermedad. Por otro lado, la variante L444P generalmente se asocia con EG 2 y 3 incluso cuando se presenta en un estado heterocigoto compuesto (49). La mutación homocigota c.1448T> C (L444P) [c.1448T> C] 1 [c.1448T> C] (L444P / L444P) sin alelos recombinantes puede asociarse tanto a fenotipos leves como graves, por lo que es necesario determinar la composición de cada una de las variantes (68).

La variante c.1342G> C (D409H) es responsable de la EG tipo 3C que se presenta con calcificaciones características de las válvulas cardíacas. A pesar de las observaciones reportadas previamente, se encuentra comúnmente que los miembros de la misma familia informan de la variabilidad en la manifestación de los síntomas incluso con un genotipo idéntico, lo que sugiere que una correlación genotipo-fenotipo aún es tentativa (67,68).

Park *et al.*, (2002) señalaron que se había identificado una sustitución E326K en pacientes con los 3 tipos de enfermedad de Gaucher, pero en cada caso se encontró el mismo alelo con otra variante en *GBA* (69). Los autores identificaron el alelo E326K en el 1.3% de los pacientes con enfermedad de Gaucher y en el 0.9% de portadores asintomáticos en homocigosidad, lo que indicaba que era probablemente un polimorfismo. Esto causó mucho debate en la literatura y aún no está claro si esta variante es realmente patógena para EG, ya que también se encontró en pacientes controles (70). Sin embargo, cuando se asocia con otras variantes *GBA* en el mismo alelo, puede causar un deterioro grave de la actividad *GCasa* (71). Curiosamente, la misma mutación parece estar significativamente asociada con un mayor riesgo de EP (72).

Tayebi *et al.*, (2003) estudiaron muestras de ADN de 240 pacientes con EG, utilizando varios enfoques complementarios para identificar y caracterizar alelos

recombinantes. Entre 480 alelos estudiados, se identificaron 59 alelos recombinantes, que incluyen 34 conversiones de genes, 18 fusiones y 7 duplicaciones posteriores. Al menos 1 alelo recombinante estaba presente en el 22% de los pacientes. Varios pacientes portaban 2 recombinaciones o mutaciones en el mismo alelo. La homocigosidad para un alelo recombinante se asoció con letalidad temprana. Se identificaron diez sitios diferentes de cruce y una secuencia de motivo pentámero compartido (CACCA) que podría ser un punto de acceso para la recombinación (73).

Emre *et al.*, (2008) analizaron el gen *GBA* en 57 pacientes turcos no relacionados con la EG e identificaron 103 alelos mutantes (90,3%) con 11 variantes diferentes, 3 de las cuales eran nuevas. Las variantes más frecuentes incluyeron L444P (42%), N370S (30%), D409H (4.3%) y R463C (3.5%) (74).

4.3.1 VARIANTES ASOCIADAS A EG1

Tsuji y col. (1987) identificaron una sustitución L444P en el gen *GBA* en pacientes con EG1,2 y 3. Los 4 pacientes con EG1 tenían la mutación como un solo alelo y presumiblemente eran heterocigotos compuestos con otra mutación *GBA* patogénica no identificada (64).

En 3 pacientes judíos Ashkenazi no relacionados con la EG1 Tsuji *et al.*, (1988) identificaron una mutación homocigota en el gen *GBA* (N370S) Otros estudios mostraron que 15 de 21 pacientes adicionales tipo I tenían 1 alelo con esta mutación. La mutación N370S no se identificó en pacientes con el EG2 o 3. Un paciente con enfermedad de tipo I era heterocigoto compuesto para N370S y L444P (75).

Entre 62 pacientes judíos asquenazíes con EG, Zimran *et al.*, (1991) encontraron que la variante N370S representaba el 73% de los 124 alelos mutantes, lo que hace que N370S sea el alelo de *GBA* mutante más común entre los pacientes AJ con enfermedad tipo I (70).

4.3.2 VARIANTES ASOCIADAS A EG2

Tsuji y col. (1987) identificaron una variante homocigota en el gen *GBA* (L444P) en pacientes con enfermedad de Gaucher tipo II (75).

Wigderson y col. (1989) informaron sobre un paciente con enfermedad de tipo II que era compuesto heterocigoto para 2 variantes en el gen *GBA*: L444P y P415R (76).

Grace y col. (1990) utilizaron la mutagénesis dirigida al sitio y la caracterización de la beta-glucosidasa mutante expresada para comprender la base molecular de la variación fenotípica entre EG2 y EG3. Los resultados sugirieron que la presencia de al menos 1 alelo *GBA* no funcional en pacientes de tipo II puede proporcionar una base molecular para los distintos fenotipos entre los tipos II y III (77).

Stone y col. (2000) identificaron variantes en el gen *GBA* en 17 pacientes no relacionados con la EG2 con un inicio de 3 a 12 meses de edad (78).

4.3.3 VARIANTES ASOCIADAS A EG3

Dahl y col. (1990) mostraron que el grupo más grande de pacientes con EG3 se ha notificado en la provincia de Norrbotten en Suecia presentando la variante homocigótica L444P en el gen *GBA* (79).

Koprivica y col. (2000) encontraron que la homocigosidad para L444P estaba asociada con la EGIII (80)

Park y col. (2003) estudiaron 16 pacientes EG3 que formaban parte de un subgrupo de pacientes que manifestaban epilepsia mioclónica progresiva (3A). Se encontraron 14 genotipos diferentes, pero había varios alelos compartidos, incluidos V394L, G377S y N188S. Los genotipos fueron diferentes de los encontrados en la mayoría de los pacientes con el tipo 3, y algunos de los alelos compartidos en estos pacientes habían sido previamente asociado con la EG1. Los estudios occidentales mostraron que los pacientes carecían de la isoforma enzimática de 56 kD procesada, generalmente indicativa de enfermedad

neuropática. Aunque el espectro del genotipo era distinto del resto de la EG3, Park *et al*, (2003) concluyeron que la falta de un genotipo compartido específico y la variabilidad de las presentaciones clínicas indicaron una contribución de otros modificadores genéticos y ambientales (81).

4.4 MANIFESTACIONES CLINICAS

La deficiencia de la enzima conduce a acumulación de glucosilceramida y otros glicolípidos en los lisosomas de los macrófagos, principalmente en el bazo, hígado, médula ósea, cerebro, osteoclastos y menos a menudo en los pulmones, la piel, los riñones, la conjuntiva y el corazón. Las manifestaciones clínicas de la EG son variables, dependiendo del tipo que se presente y generalmente cursa con hepatoesplenomegalia, citopenias, usualmente anemia y trombocitopenia, disnea y manifestaciones óseas y hemorrágicas (54).

✓ MANIFESTACIONES HEMATOLOGICAS

Las anomalías hematológicas en la EG son extremadamente comunes. La mayoría de los pacientes sintomáticos presentan una disminución en los glóbulos rojos sanos, generando anemia y provocando una fatiga intensa. Esto puede deberse a la hematopoyesis deprimida resultante de la sustitución de la médula ósea por las CG. La EG también afecta las células responsables de la coagulación, lo que puede provocar anormalidades hematológicas que incluyen astenia, disnea y hemorragias dependiendo del tipo y grado de citopenias del paciente (82). Cambios en las cifras hematimétricas pueden utilizarse para valorar la respuesta al tratamiento, en conjunto con la valoración de las demás manifestaciones de la enfermedad (83)

✓ MANIFESTACIONES VISCERALES

Debido a la acumulación de CG en bazo, en la gran mayoría de los pacientes presenta esplenomegalia. Los volúmenes del bazo en la EG1 son típicamente 5-15 veces lo normal, pero el tamaño del bazo puede aumentar de manera

significativa en algunos casos y pueden ser más de 50 veces lo normal (49). Las masas esplénicas focales son comunes y pueden representar grupos de CG o hematopoyesis extramedular. La hepatomegalia se observa en 60% a 80% de los pacientes. El desarrollo de fibrosis y cirrosis posterior es raro. Se puede observar infarto hepático y esplénico, que se manifiesta con dolor abdominal pseudoquirúrgico agudo (84).

Aunque menos frecuente, también se puede reportar afección en el sistema pulmonar; generalmente se observa con mayor frecuencia en EG1. Los hallazgos pulmonares se piensan que son secundarios a la infiltración directa de CG en los espacios intersticiales, espacios alveolares y capilares, así como por causas indirectas secundarias al síndrome hepatopulmonar.

En raras ocasiones, la afectación renal, que se manifiesta como proteinuria y hematuria, refleja la infiltración de glomérulos por las CG (1,49). La afectación miocárdica o valvular es muy raramente observada.

✓ **MANIFESTACIONES ÓSEAS**

Independientemente de la edad de inicio de la enfermedad, presencia o gravedad de afectación visceral y hematológica, todos los pacientes con EG tienen riesgo de complicaciones óseas. La afectación suele desarrollarse de forma silente, sin sintomatología evidente. Las manifestaciones óseas incluyen retraso del crecimiento en niños, osteopenia, lesiones líticas, fracturas patológicas, dolor, osteonecrosis cortical, infartos medulares y crisis óseas (83). Se ha detallado que en la formación del hueso participan varios factores sistémicos sobre los osteoblastos y osteoclastos (corticosteroides, hormona paratiroidea, prostaglandinas, citocinas, factor de crecimiento mediado por plaquetas), que, al ser afectados por la EG, promueven remodelación ósea asociada a función osteoclástica anormal e infartos óseos (1,84,85)

Las CG se acumulan en la médula ósea y provocan una respuesta inflamatoria local, esta es la causa de la lesión ósea. La fisiopatología de la forma en que la infiltración conduce a los cambios en el hueso no es bien conocida. La gravedad

de los hallazgos óseos depende de la extensión de la sustitución de la cavidad medular. El reemplazo de la médula ósea con CG puede conducir a la expansión de la cavidad medular con el adelgazamiento de la corteza, festoneado endosteal y la consecuente osteopenia difusa. Además, la expansión medular conduce a un fallo de la remodelación en el fémur distal resultando la llamada “deformidad en matraz de Erlenmeyer” (85,86).

✓ **MANIFESTACIONES NEUROLÓGICAS**

Los hallazgos neuropatológicos más consistentes en la afectación del sistema nervioso central en EG son los acúmulos de CG periadventiciales, así como la pérdida neuronal y la astrogliosis. Todos los pacientes con EG, incluidos los del tipo 1, presentan CG perivasculares y gliosis no específica de la sustancia blanca (52). Sin embargo, en los pacientes que presentan síntomas del SNC, se observaba que las CG infiltran el parénquima cerebral, fundamentalmente el hipocampo y el cuerpo estriado. También se observa gliosis inespecífica perivascular y de la sustancia gris en núcleos de ganglios basales, núcleo dentado del cerebelo e hipotálamo (87,88).

Las manifestaciones neurológicas más comunes cursan con retraso del desarrollo, pérdida de habilidades adquiridas, convulsiones y movimientos oculares sacádicos (desplazamientos oculares de un punto a otro a alta velocidad), cuya función es traer la imagen desde la periferia hasta el centro de la retina, donde la agudeza visual resulta mayor. Además, estos pacientes desarrollan alteraciones bulbares con estridor y dificultad para la deglución, signos de afectación extrapiramidal con aumento del tono muscular, opistótonos, cabeza con retroflexión y espasticidad (88).

En estudios realizados por Giraldo *et al.*, (2008) se obtuvo información de 99 pacientes afectados y 266 familiares (portadores no afectados y no portadores) con EG, en donde encontraron que, de los pacientes afectados, el 32,6% presentaban manifestaciones neurológicas como: temblor (8,7%), movimientos incoordinados (9,8%), falta de concentración (11,9%), estrabismo (7,6%), hipoacusia (8,7%), enfermedad de Parkinson (EP) (7,6%) y neuropatía periférica

(10,9%). En cuanto a los familiares (primer/segundo grado de consanguinidad), 36 (13,5%) presentaron alguna manifestación neurológica: EP en 14 casos (4,9%), epilepsia 8 (3,0%), temblor en 7 (2,6%), hipoacusia en 2 (0,7%) y otros en 5 (1,9%) (89). La frecuencia de manifestaciones neurológicas en portadores de variantes en el gen *GBA* fué del 17,3%, frente al 5,7% en los no portadores ($p = 0,0096$). Concluyeron que manifestaciones como la EP tuvieron en pacientes con EG1 y sus familiares una incidencia superior a la esperada y aparecieron más frecuentemente en portadores de L444P o variantes raras (88,89).

4.5 DIAGNOSTICO

El diagnóstico de la EG se realiza a partir de una sospecha clínica inicial (2) dada por la historia familiar y paraclínicos que muestran trombocitopenia de diversos grados ($<60 \times 10^9$ plaquetas / L en 26% de casos; $<120 \times 10^9$ plaquetas / L en el 76% de los casos), anemia en el 56% de los casos, con niveles de hemoglobina inferiores a 9 g / dl y niveles de proteína C reactiva (PCR) que pueden ser altos en crisis óseas (infarto óseo) o complicaciones infecciosas (colecistitis más común en EG) (90). La deficiencia de vitamina D parece ser más común en EG que en la población general. En comparación con sujetos control, los pacientes con EG1 han mostrado niveles disminuidos de colesterol HDL. La resonancia magnética abdominal es el examen más apropiado para evaluar dimensiones de volumen del hígado y el bazo y su morfología. El bazo a veces presenta nódulos, sugerentes de linfoma. Cuando la resonancia magnética no está disponible se puede usar una ecografía abdominal en su lugar. Por otro lado, la resonancia magnética ósea es la prueba de elección para evaluar los efectos de EG en el hueso; permite reconocer infartos óseos y reflejar el reemplazo de la grasa normal de la médula ósea por CG (1,61,91,92).

La aspiración de médula ósea no es obligatoria para confirmar un diagnóstico de EG, pero puede realizarse en pacientes sin diagnóstico cuando se encuentran trombocitopenia y/o esplenomegalia aisladas y puede ayudar cuando se encuentran CG. Sin embargo, puede ser difícil distinguir las CG de las llamadas células "pseudo-Gaucher" observadas en algunos trastornos sanguíneos o enfermedades infecciosas, como el mieloma con acumulación histiocítica de

cristales de inmunoglobulina, enfermedad de Waldenstrom y otros linfomas con gammapatía monoclonal. leucemia mieloide crónica o mielodisplasia o micobacterias atípicas (93,94)

Como prueba confirmatoria se utiliza la determinación de la deficiencia en la actividad enzimática de la β -glucocerebrosidasa en los leucocitos, células mononucleares, o fibroblastos cultivados; esta última se considera el Gold Standar como prueba diagnóstica ya que los hallazgos histopatológicos en el hígado, bazo o médula ósea no siempre son confiables, además de representar procedimientos muy invasivos (1,95,96)

Finalmente, para conocer la alteración genética exacta que causa la enfermedad, se pueden determinar las variantes genéticas involucradas, y por ende una mejor visualización de polimorfismos y posible heterogeneidad de la enfermedad. Para este caso se realizan pruebas moleculares de secuenciación del gen o del exoma completo, las cuales permiten evidenciar las variantes asociadas al gen (79,95).

4.6 TRATAMIENTO

Los objetivos básicos del tratamiento son la eliminación o la disminución de los signos y síntomas, la prevención de complicaciones irreversibles, y mejora en la salud general y la calidad de vida del paciente y su familia. Un objetivo adicional en los niños es la optimización del crecimiento.

Hasta 1991, la enfermedad era considerada una rareza clínica, cuyo tratamiento era exclusivamente sintomático (9). En 1974, se demostró que la infusión intravenosa de glucocerebrosidasa placentaria purificada reducía los niveles hepáticos y sanguíneos de glucocerebrósido, pero los resultados no fueron consistentes (39). Posteriormente, y luego de la modificación química de la enzima para dirigirla hacia los macrófagos, se observaron respuestas clínicas objetivas en un estudio piloto realizado por Barton *et al.*, (96).

Actualmente, en Colombia existen 4 medicamentos, con aprobación por parte del Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos (Invima), para el tratamiento de la enfermedad de Gaucher: imiglucerasa (Cerezyme ®), miglustato (Zavesca ®), velaglucerasa alfa (Vpriv ®) y taliglucerasa alfa (Uplyso ®) (6).

✓ **TERAPIA DE REEMPLAZO ENZIMATICO (TRE)**

La TRE se basa en técnicas para corregir por vía intravenosa la deficiencia enzimática subyacente que causa los síntomas de la enfermedad. En el caso de la EG, esta terapia equilibra los niveles bajos de la enzima glucocerebrosidasa (GCasa) con una versión modificada de la enzima. Esta enzima descompone el glucocerebrósido, y compensa la enzima faltante, razón por la cual la terapia se llama reemplazo enzimático. Desde su aprobación en 1991 por la FDA, su uso en la práctica clínica habitual ha modificado la historia natural de esta enfermedad (52).

No es una cura para la EG, es decir: no repara el defecto genético subyacente, pero puede revertir y prevenir numerosas manifestaciones de EG tipo 1. El objetivo de TRE es proporcionar una cantidad suficiente de enzima para permitir el procesamiento del material acumulado para pacientes, incluidos niños con EG que manifiestan signos y síntomas (97). La TRE está bien establecida como un tratamiento eficaz para reducir los síntomas hematológicos, viscerales y óseos. Pero la enzima recombinante no atraviesa la barrera hematoencefálica, y no hay evidencia de que la TRE haya revertido, estabilizado o enlentecido la progresión de la afectación neurológica (98)

Históricamente, la mayoría de los pacientes han recibido la enzima recombinante imiglucerasa (99). Todos son preparaciones enzimáticas GC recombinantes basadas en la secuencia del gen humano *GBA* normal , pero difieren en el tipo celular involucrado en su producción: la imiglucerasa se genera a partir de células de ovario de hámster chino, la velaglucerasa alfa se genera a partir de una línea celular humana similar a fibroblastos y la taliglucerasa alfa se genera a partir de una línea celular de zanahoria (98,99).

La imiglucerasa (Cerezyme ®) fué aprobada por la EMA por primera vez el 17 de Noviembre de 1997 con autorización renovada el 17 de septiembre de 2007 (EU/1/97/053/005) y tiene registro del Invima en febrero de 2010; funciona como TRE a largo plazo en pacientes con un diagnostico de EG1 y EG3 que presentan manifestaciones no neurológicas clínicamente importantes de la enfermedad.

Debe administrarse por perfusión intravenosa y, aunque a nivel mundial tiene 2 presentaciones comerciales, en Colombia solo tiene registro sanitario el vial de 400 U (unidades enzimáticas) en polvo para realizar una solución para infusión. Si bien la posología indicada varía de acuerdo con la evaluación de todas las manifestaciones clínicas de la enfermedad, se recomiendan dosis iniciales entre 2.5 U por kilogramo 3 veces por semana hasta 60 U por kilogramo cada 2 semanas (6).

Velaglucerasa alfa (Vpriv ®), un medicamento indicado para reemplazo enzimático a largo plazo en pacientes con EG1. Fué aprobada por la FDA en 2010 y tiene registro sanitario del Invima desde octubre de 2011. Su presentación comercial es en viales de 400 unidades enzimáticas en polvo para realizar una solución para infusión. Se recomienda una dosis de 60 unidades por kilogramo cada dos semanas.

Finalmente, la taliglucerasa alfa (Uplyso ®) es una TER indicada para pacientes adultos con EG1 y para pacientes pediátricos con manifestaciones viscerales y hematológicas de la EG. Fué aprobada por la FDA en 2012 y tiene registro sanitario del Invima desde diciembre de 2013. Su presentación comercial es de viales de 200 unidades enzimáticas en polvo liofilizado para infusión intravenosa, aunque se vende en cajas de 1, 2, 5 y 10 frascos. Tiene una posología indicada que varía entre 30 y 60 unidades por kilogramo cada dos semanas (6)

Las metas terapéuticas evaluadas, como visceromegalias, alteraciones celulares plasmáticas, lesiones óseas se han reportado en un 95 % de los pacientes logrando los objetivos terapéuticos de la TRE, lo que demuestra una alta eficacia

de la terapia en el control y evolución de la enfermedad. Las reacciones adversas graves son poco frecuentes; las reacciones agudas de hipersensibilidad son extremadamente raras. Se reporta que alrededor del 5 % de los pacientes experimentan síntomas como prurito, erupción cutánea y ocasionalmente laringoespasmo, que ceden con la administración de antihistamínicos y esteroides (91,100,101,102).

Los pacientes con enfermedad de Gaucher de tipo 2, dado lo agudo de su evolución, fallecen en un alto porcentaje antes del año; algunos reciben TRE sin embargo la respuesta puede ser nula por lo que actualmente se discute su uso (103,104).

TERAPIA DE REDUCCIÓN DE SUSTRATO (TRS)

El objetivo de TRS es minimizar la acumulación del exceso de material de glucosilceramida dentro de las células al inhibir la enzima sintética apropiada , conocida como la glucosilceramida sintasa. Esto conducirá a una disminución de la producción de lípidos peligrosos y la capacidad de la enzima residual para establecer un nuevo estado estacionario (105)

La TRS está indicada para pacientes con EG sintomática leve a moderada en quienes la TRE no es apropiada o no constituye una opción terapéutica. Debe ser indicada y supervisado por médicos con experiencia en EG. El miglustato (Zavesca ®), TRS obtuvo aprobación de la FDA en 2003 y tiene registro del Invima en Colombia desde diciembre de 2009. Se vende en cápsulas de 100 mg y, de acuerdo con el registro sanitario, está indicado solamente para pacientes adultos con EG1 que han tenido reacciones de hipersensibilidad a la imiglucerasa o que no han respondido adecuadamente a la misma. Para tratamiento de EG1, se recomienda una dosis inicial de 100 mg administrados 3 veces al día. (104,105) Las terapias de reducción de sustrato, como Miglustat, no han mostrado ser beneficiosas para las manifestaciones neurológicas en el tipo 3 de EG (57). No está recomendado en menores de 18 años o mayores de 65 años. Contraindicado en el embarazo, lactancia y en varones y mujeres que desean tener hijos (106,107).

Otro agente usado en la TRS es Eliglustat (Cerdelga®), un agente novedoso con aparentemente un mejor perfil de seguridad y mayor eficacia. Su mecanismo de acción es por inhibición parcial de la enzima glucosilceramida sintetasa disminuyendo así, la producción de glucocerebrosidos. La molécula es química y biológicamente diferente del miglustat. Fué aprobada por la FDA el 28 de Agosto del 2014 (9) y EMA (EU/1/14/974/001 56 cápsulas) (6). En Colombia mediante Resolución No. 2016012809 de 18 de Abril de 2016, el INVIMA aprobó la evaluación farmacológica para esta TRS (INVIMA 2018M-0018473) (108)

✓ **Interferencia de ARN (ARNi) como mecanismo para promover la reducción del sustrato (109)**

Es una nueva tecnología que ha revolucionado la forma en que los investigadores estudian la expresión génica en mamíferos. Ha tenido un impacto significativo en la facilidad, velocidad y la especificidad con la que se puede realizar la pérdida del análisis de la función génica en células de mamíferos y modelos animales. Por lo tanto, se está convirtiendo en el método de elección para los estudios de pérdida de función. Al estar basada en un proceso de silenciamiento génico postranscripcional que ocurre naturalmente, la tecnología RNAi aprovecha la maquinaria natural de la célula, facilitada por siRNAs, para derribar efectivamente la expresión del gen objetivo. Los informes sobre el uso de RNAi para lograr la reducción de sustrato en EDL, disminuyendo artificialmente su tasa de biosíntesis son limitados. Originalmente, se usaba para inhibir los genes implicados en el metabolismo de los glucosfingolípidos, y posteriormente se probó su capacidad en la EG, sin embargo, es necesaria más información sobre los efectos adversos (110).

✓ **TERAPIA FARMACOLÓGICA DE CHAPERONAS (TFC)**

La terapia farmacológica de chaperones (PCT) son inhibidores competitivos reversibles del sitio activo que se unen selectivamente y estabilizan la enzima GC mutada mal plegada, evitando así en el retículo endoplásmico (RE), la degradación asociada en el proteosoma; además restablecen la actividad enzimática y eliminan el sustrato almacenado (111). También facilita el tráfico de la enzima a los lisosomas y tiene el potencial de atenuar la respuesta de la

proteína desplegada y prevenir el estrés de RE que puede conducir a la apoptosis y la respuesta inflamatoria (112). Este enfoque es especialmente aplicable en EG porque solo un aumento modesto residual en CG debería ser suficiente para mejorar el fenotipo.

Otra ventaja es que TFC puede cruzar la barrera hematoencefálica y puede estar disponible por vía oral. La combinación de TRE y TFC debería mejorar el efecto de TRE, ya que TFC ayuda en el tráfico del GC mutante endógeno fuera del RE a los lisosomas donde pueden tener alguna actividad residual. TFC también puede estabilizar la enzima recombinante y aumentar su vida media en la circulación (111,112).

✓ **TRASPLANTE DE MÉDULA ÓSEA (TMO)**

Para la EG y otros trastornos lisosomales, se extraen y reemplazan las células que forman la sangre que han sufrido daño a causa de la enfermedad, lo cual puede revertir muchos de los signos y síntomas. Se ha utilizado el TMO de donante de tipo salvaje porque los monocitos de la sangre periférica pueden migrar a través de la barrera hematoencefálica y convertirse en células microgliales del SNC que podrían afectar la corrección cruzada metabólica (113). Las células madre pluripotentes inducidas son una alternativa atractiva para generar células progenitoras hematológicas o células progenitoras neurales para la terapia génica celular o mejorada directa (112,113). El TMO se realizaba en pacientes con EG que presentaban afectación neurológica grave, sin embargo no era efectivo para la enfermedad del SNC debido a la falta de enzima secretable. Con ello se corregía el defecto metabólico, se mejoraba el recuento sanguíneo y se reducía el volumen del hígado; sin embargo, solo unos pocos individuos presentaban una mejora de las afectaciones óseas y neurológicas. Dentro de los efectos adversos al recibir TMO se reporta el riesgo de desarrollar la enfermedad de injerto contra huésped. Esta afección ocurre cuando las células madre del donante que conforman el nuevo sistema inmunitario consideran que los tejidos y órganos del cuerpo son extraños y los atacan; adicionalmente, puede ocurrir, daño en los órganos, infecciones, cataratas, desarrollo de cáncer

y muerte, por tanto, debido a su elevada morbilidad y mortalidad, este tratamiento ha sido reemplazado, principalmente, por la TRE (112, 113).

✓ **OLIGONUCLEÓTIDOS ANTISENTIDO**

Los oligonucleótidos son secuencias cortas de ácidos nucleicos diseñados para unirse a secuencias específicas de ADN (formación de ADN triplex) o ARN (formación de heteroduplex ARN-ADN). Son complementarios de secuencias específicas de un determinado ARN mensajero. La formación de un heteroduplex bicatenario sentido-antisentido bloquea la traducción del mensaje genético a proteína. El objetivo es activar selectivamente los mecanismos celulares de reparación del ADN, en el lugar de la mutación. Para ello se diseñan oligonucleótidos específicos para secuencias genómicas adyacentes al lugar de la mutación, en cuyo extremo el oligonucleótido lleva un agente capaz de lesionar el ADN, mediante la formación de un enlace covalente con el nucleótido responsable de la mutación. La lesión selectiva del nucleótido mutado, desencadena el proceso celular de reparación del ADN que conduce a una normalización estructural y funcional del gen.

Para la EG la eliminación de UDP-glucosa ceramida glucosiltransferasa (UGCG) utilizando un ARNip se ha probado en un esfuerzo por reducir los niveles de glucoesfingolípidos. Sin embargo, su utilización se ha visto limitada por su corta vida media en la circulación sistemática y su dificultad para acceder con actividad funcional al citoplasma y/o núcleo célula (109)

✓ **TERAPIA GÉNICA**

Los ensayos limitados en modelos de ratón con EG mostraron una evidencia de la posibilidad de desarrollar protocolos de acondicionamiento seguros y eficientes para enfermedades que requieren solo un bajo nivel de células normales o con corrección genética para un resultado terapéutico permanente y beneficioso. Aunque algunas células transducidas han producido alguna enzima, la producción de enzima no parece ser sostenida y, por lo tanto, no da como resultado una cura permanente. Se anticipa que las células transducidas no

tendrían una ventaja proliferativa sobre las células no corregidas. Además, es poco probable que ocurra una corrección cruzada metabólica significativa ya que solo pequeñas cantidades de enzima se secretan en la circulación (113,114).

En Mayo de 2019 el laboratorio Avrobio realizó un estudio adaptativo, multinacional y abierto para evaluar la seguridad y la eficacia de la terapia génica conocida como AVR-RD-02 en modelos de ratón. Los ratones utilizados en el estudio carecían del gen *GBA* e imitaban la enfermedad de Gaucher observada en pacientes. El estudio encontró altos niveles de beta-glucocerebrosidasa en ratones tratados con AVR-RD-02, lo que ayudó a eliminar el glucocerebrosida del bazo y a revertir la hinchazón. También se detectaron niveles constantes de la enzima en otros órganos, como el hígado y la médula ósea de los animales, lo que también se correlacionó con una reducción en los niveles de glucocerebrosida en estos sitios. El tratamiento evitó la progresión de la enfermedad.

Para diciembre de 2019 se estaban reclutando pacientes con EG1 para un ensayo clínico de fase 1/2 (NCT04145037) en Canadá que probaría la seguridad y eficacia de AVR-RD-02. Los niveles y actividad de la beta-glucocerebrosidasa, el volumen del bazo y el hígado, y la densidad mineral ósea serán monitoreados para evaluar la eficacia del tratamiento; la seguridad se evaluará en todo momento. Los resultados de este estudio se planean contemplar en septiembre de 2022 (115,116).

Así mismo, en diciembre de 2019 la FDA otorgó la designación de medicamento huérfano para Prevail Therapeutics(PR001) ®, una terapia génica que utiliza una versión modificada e inofensiva de un virus adenoasociado (AAV9) para administrar una versión completamente funcional del gen *GBA* a las células nerviosas. Al restaurar la producción de beta-glucocerebrosidasa normal en las células cerebrales afectadas, se pretende que una dosis única de PR001 alivie los síntomas de Gaucher y modifique el curso de la enfermedad. Al restaurar la producción de beta-glucocerebrosidasa normal en las células cerebrales afectadas, se pretende que una dosis única de PR001 alivie los síntomas de Gaucher y modifique el curso de la enfermedad (117).

Prevail Therapeutics anunció a principios de enero 2020 que estaba avanzando con un ensayo clínico de Fase 1/2 diseñado para probar la terapia génica en personas con EG 2, y la dosificación está planeada para comenzar en la primera mitad de este año. La compañía también planea otro ensayo de Fase 1/2 en personas con EG3 a finales de este año. Estos pacientes también experimentan síntomas neurológicos, pero son más leves y progresan más lentamente que los observados en personas EG 2.

PR001 está diseñado para entregar una versión completamente funcional del gen GBA1 a las células nerviosas y restaurar la producción de enzimas. La terapia génica potencial se dirige a pacientes con EG2 y EG3. Como la terapia de reemplazo enzimático existente no puede cruzar la barrera hematoencefálica y llegar al cerebro, es ineficaz en pacientes con EG2, la terapia puede ayudar a las personas con la EG3 más leve. (35,104). Esta variabilidad en el tratamiento se ha debido a la heterogenicidad genética, así como a la edad de inicio del tratamiento y a la respuesta a él, que puede ser positiva en algunos casos, aunque algunos autores coinciden en que más que nada es la evolución de este tipo 3 (104).

Finalmente, varias opciones para el tratamiento de EG están disponibles actualmente, la elección de las cuales dependerá de muchos factores que incluyen la edad del paciente, la disponibilidad del medicamento, el costo y efectos secundarios. Las terapias futuras serán importantes para el avance en el manejo de la enfermedad, logrando cruzar exitosamente la barrera hematoencefálica y por tanto siendo más efectiva en las formas neuropáticas

5. METODOLOGÍA

5.1 TIPO DE ESTUDIO

Estudio transversal, descriptivo, no experimental en donde se caracterizaron genómicamente las variantes del gen *GBA*, calculando su frecuencia poblacional en una muestra de pacientes con patologías diferentes y no diagnosticados clínicamente con enfermedad de Gaucher del Suroccidente Colombiano.

Este proyecto contó con la aprobación del Comité científico de ética y bioética de la Universidad Santiago de Cali “CEB-USC” Facultad de Salud en la sesión 17 de abril 2020 según el acta N°07.

CRITERIOS DE INCLUSIÓN

Paciente con enfermedad compleja, sin sospecha clínica de enfermedad de Gaucher con resultados de secuenciación de exoma completo obtenido de la base de datos del Instituto de Genética Médica – GENOMICS (Cali)

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

Pacientes que no hubieran firmado el respectivo consentimiento informado – asentimiento para toma de muestra y uso de datos.

5.2 DATOS DE ESTUDIO

Se utilizaron los resultados de secuenciación de exoma completo de 320 pacientes sin sospecha de enfermedad de Gaucher, pertenecientes a la base de datos del Instituto de Genética Médica – GENOMICS (Cali).

- Secuenciación de Exoma

Técnica basada en la extracción de DNA mediante estuche Qiagen; posteriormente se realizó la secuenciación masiva de librerías Nextera TM mediante plataforma Illumina con cobertura de 100X. Se ejecutó un alineamiento con genoma de referencia GRCh38/hg19, posteriormente analizado con el

programa CRAVAT que proporciona servicios de alto rendimiento para que los investigadores anoten y prioricen genes y variantes del exoma a pequeña escala. Se proporcionan anotaciones a nivel de variantes, genes y puntajes bioinformáticos para permitir la interpretación y priorización de las variantes identificadas en los estudios de secuenciación, que incluyen desplazamiento de marcos de lectura, inserciones / deleciones, sitio de empalme, missense y nonsense (118), realizando un mapeo de variantes (transcripciones del genoma <-> secuencia de la proteína <-> estructura de la proteína <->), lo que permite evaluar millones de variantes en un solo paso; es útil para facilitar la evaluación de alto rendimiento, y proporcionar puntajes predictivos para variantes en la línea germinal. (119)

- Editor de VCF

Los datos de exoma en formato VCF se sometieron al programa Editor VCF v.1.0 creado en la tesis doctoral de “Representación De La Variabilidad Genómica Del Complejo Mucopolisacaridosis En El Suroccidente Colombiano” el cual permitió editar el formato VCF de los exomas, y convertirlo en un programa de Excel, con el objetivo de aplicar los diferentes filtros de búsqueda y obtener un archivo final con la información de interés. Visualizando columnas organizadas según cromosoma, posición, aminoácido alterado, registro en clinvar, entre otras características (120).

5.3 ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO

Las variantes encontradas en el gen *GBA* se analizaron mediante una búsqueda en bases de datos poblacionales, de genomas, de enfermedades y de secuencias con el objetivo de comprobar si estas han sido previamente descritas (tabla 2) . Además sus implicaciones patológicas se determinaron a través de herramientas bioinformáticas, mediante tecnología *in-silico*, que permite predecir las consecuencias de las variantes genéticas en la estructura y función de las proteínas, además de estudiar características como cambios en las propiedades físico-químicas de los aminoácidos sustituidos, grado de conservación evolutiva, el entorno de la secuencia de un aminoácido afectado o la alteración en las propiedades estructurales de la proteína

- BASES DE DATOS POBLACIONALES

✓ Proyecto 1000 genomas (<https://www.internationalgenome.org/>)

El proyecto 1000 Genomas (1000GP), fué pionero en emplear la secuenciación masiva de miles de individuos mediante tecnología NGS. Desde su inicio en 2007, este proyecto ha logrado secuenciar el genoma de 2.504 personas de 5 continentes y 26 poblaciones distintas (121). desde chinos inmigrantes en Denver, Colorado, hasta miembros de la tribu Luhya en Kenia, describe un catálogo de 84,7 millones de variantes que amplía en un 40 % el número de variantes conocidas del genoma humano. Aunque se detalla una amplia diversidad genética, la mayoría de variantes (el 86 % de estos 84,7 millones) se encuentran restringida a los individuos de un solo continente, especialmente entre las poblaciones subsaharianas del continente africano.

Según la información del proyecto cada persona participante en el estudio es portadora de 150 a 180 variantes que provocan la finalización prematura de proteínas y de 24 a 30 variantes implicadas en enfermedades raras. En este proyecto se detallan 68.818 variantes estructurales, que pueden tener hasta 500.000 bases de longitud, informan 42.279 supresiones bialélicas, 6.025 duplicaciones bialélicas, 2.929 mCNVs (variaciones en el número de copias multialélicas), 786 inversiones, 168 inserciones mitocondriales nucleares y 16.631 inserciones de elementos móviles.

Las muestras del Proyecto 1000 Genomas proporcionan una amplia representación de la variación genética humana; incorporan múltiples estrategias de análisis, conjuntos de llamadas y tipos de variantes. Las muestras de proyectos y datos resultantes se pueden compartir ampliamente, lo que permite comparar estrategias de secuencia y métodos de análisis fácilmente en un conjunto de muestras de referencia; presenta un acceso gratuito en la web y permite una búsqueda amigable de las variantes reportadas hasta el momento en la población (122).

✓ **Exome Aggregation Consortium (Exac)**
(<http://exac.broadinstitute.org/>)

Plataforma que busca agregar y organizar los datos de secuenciación de exoma de una variedad de proyectos de secuenciación a gran escala, y poner a disposición de la comunidad científica más amplia datos resumidos. El conjunto de datos proporcionado en este sitio web abarca 60.706 individuos no relacionados secuenciados como parte de varios estudios genéticos específicos de población y enfermedades. Esta web ha eliminado individuos afectados por enfermedad pediátrica grave, por lo que este conjunto de datos debería servir como un conjunto útil de referencia de frecuencias de alelos para estudios de enfermedades graves (123). Todos los datos en bruto de estos proyectos se han reprocesado y se han llamado conjuntamente a variantes para aumentar la coherencia entre los proyectos como 1000 Genomas, Bulgarian Trios, Finland-United States Investigation of NIDDM Genetics (FUSION), GoT2D, Inflammatory Bowel Disease, METabolic Syndrome In Men (METSIM), Jackson Heart Study, Myocardial Infarction Genetics Consortium, NHLBI-GO Exome Sequencing Project (ESP), National Institute of Mental Health (NIMH) Controls, The Cancer Genome Atlas (TCGA). Se encuentra disponible y de acceso gratuito en la web para utilizar y comparar datos de variantes registradas.

BASES DE DATOS DE GENOMAS:

✓ **Ensembl Genome Browser (<http://www.ensembl.org/index.html>).**

El proyecto comenzó en 1999 con el fin último de anotar automáticamente el genoma, integrar dicha anotación con otros datos biológicos disponibles, y publicar toda esta información en línea y de manera gratuita, algo que viene haciendo desde el 2000. La cara más visible del proyecto es su visor genómico y su repositorio de recursos genómicos integrados, cuya densidad varía en función de la especie, siendo las de mayor completitud (análisis funcional) la de humano, ratón, rata y pez cebra, precisamente los genomas más consultados. Todas las especies disponen de anotaciones genéticas basadas en evidencias, así como de recursos de genómica comparativa, incluyendo alineamientos y relaciones de homología, ortología y paralogía. Todas estas anotaciones se

integran con una enorme cantidad de fuentes externas de referencia, lo que convierte a Ensembl como un recurso integrador único (124).

- BASES DE DATOS DE ENFERMEDADES

✓ Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) (<https://www.omim.org/>)

Es un compendio completo y autorizado de genes humanos y fenotipos genéticos que está disponible y actualizado diariamente. Las descripciones generales de texto completo referenciadas en OMIM contienen información sobre todos los trastornos mendelianos conocidos y más de 15.000 genes. OMIM se centra en la relación entre fenotipo y genotipo. Se actualiza diariamente y las entradas contienen enlaces a otros recursos genéticos (125).

Los fenotipos incluyen trastornos y rasgos mendelianos de un solo gen; susceptibilidades al cáncer y enfermedades complejas; variaciones que conducen a valores de prueba de laboratorio anormales pero benignos, grupos sanguíneos y enfermedad genética de células somáticas e IDH1 y glioblastomas multiforme.

✓ Clinvar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>)

ClinVar es un archivo público de acceso gratuito de informes de las relaciones entre las variaciones y fenotipos humanos; facilita el acceso y la comunicación sobre las relaciones afirmadas entre la variación humana y el estado de salud observado, y la historia de esa interpretación, procesa las presentaciones que informan variantes encontradas en muestras de pacientes, afirmaciones hechas con respecto a su importancia clínica, información sobre el remitente y otros datos de respaldo (126). Los alelos descritos en las presentaciones se asignan a secuencias de referencia y se informan de acuerdo con el estándar HGVS. Luego, el sistema presenta los datos para los usuarios, de uso libre.

El nivel de confianza en la precisión de las llamadas de variantes y las afirmaciones de importancia clínica depende en gran medida de la evidencia de apoyo, por lo que esta información, cuando está disponible, se recopila y es visible para los usuarios. Debido a que la disponibilidad de evidencia de respaldo

puede variar, particularmente con respecto a los datos retrospectivos agregados de la literatura publicada, el archivo acepta envíos de múltiples grupos y agrega información relacionada, para reflejar de manera transparente tanto el consenso como las afirmaciones conflictivas de importancia clínica.

Los archivos de ClinVar presentan información y agregan identificadores y otros datos que pueden estar disponibles sobre una variante o condición de otros recursos públicos usando códigos RS.

- **Human Gene Mutation Database (HGMD®)** (<http://www.hgmd.org>)

HGMD constituye una colección completa de mutaciones de la línea germinal publicadas en genes nucleares que subyacen o están estrechamente asociadas con enfermedades hereditarias humanas. A marzo del 2017 la base de datos contenía más de 203.000 lesiones genéticas diferentes identificadas en más de 8.000 genes seleccionados manualmente de más de 2600 revistas. Con nuevas entradas de mutación que se acumulan actualmente a una tasa superior a 17.000 por año, HGMD representa de facto el depósito central unificado de genes / orientado a enfermedades de mutaciones hereditarias que causan enfermedades genéticas humanas utilizado en todo el mundo por investigadores, médicos, laboratorios de diagnóstico y asesores genéticos, y es un herramienta esencial para la anotación de datos de secuenciación de próxima generación. La versión pública de HGMD está disponible gratuitamente para usuarios registrados de instituciones académicas y organizaciones sin fines de lucro, mientras que la versión de suscripción (HGMD Professional) está disponible para usuarios académicos, clínicos y comerciales bajo licencia a través de QIAGEN Inc (127)

- **BASES DE DATOS DE SECUENCIAS**

- ✓ **National Center for Biotechnology Information (NCBI)** (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

El NCBI es la plataforma pública estadounidense que funciona como referente mundial en información biomédica y genómica. La cantidad de recursos que NCBI pone en línea a disposición del público son realmente amplios, tanto en número como en los ámbitos de conocimiento que cubre. Tiene gran cantidad de

bases de datos según la información y características de la búsqueda. Mediante la búsqueda en dbSNP (repositorio central tanto para sustituciones como pequeñas eliminaciones e inserciones de bases de nucleótidos únicos) se obtiene información sobre el posible efecto fisiopatológico de la variante y de su frecuencia en población europea (a través de la información de Haplotype Map; HapMap). dbSNP también almacena variaciones raras y comunes con sus genotipos y frecuencias alélicas, e incluye tanto variantes clínicamente significativas en humanos como polimorfismos benignos. Actualmente, cuenta con 53 millones de RefSNP clústers (o códigos rs, que son los códigos únicos de identificación de las variaciones una vez procesadas tras su envío). Originalmente fué creada para dar soporte al descubrimiento de polimorfismos a gran escala, como el del proyecto HapMap, pero enseguida fué considerado como repositorio mundial también para otros tipos de variaciones (128).

Tabla 2. Bases de datos de poblaciones, enfermedades específicas y secuencias usadas para los análisis bioinformáticos. [Adaptada de Richards *et al.*, 2015]

Bases de datos poblacionales	
1000 genomas http://browser.1000genomes.org	Base de datos de variantes encontradas en una baja y alta cobertura de secuenciación genómica dirigida a 26 poblaciones diferentes. Proporciona diversidad en los datos pero algunos datos son de baja calidad
Exome Aggregation Consortium (Exac) (http://exac.broadinstitute.org/)	Base de datos de variantes encontradas durante la secuenciación del exoma de 61.486 individuos no relacionados
Bases de datos de genomas	

Ensembl Genome Browser (http://www.ensembl.org/index.html).	buscador de genomas de vertebrados que apoya la investigación en genómica comparada, evolución, variación de secuencia y regulación transcripcional. Actualmente cuenta con cerca de 50.000 genomas para estudio.
Bases de datos de enfermedades	
OMIM http://www.omim.org	Base de datos de genes humanos y condiciones genéticas que también contiene una muestra representativa de genética asociada a enfermedades variantes.
Clinvar http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar	Base de datos de afirmaciones sobre el significado clínico y relación fenotípica de la variación humana.
Human Gene Mutation Database http://www.hgmd.org	Base de datos de anotaciones variantes publicadas en la literatura. Requiere suscripción de pago para gran parte del contenido
Base de datos de secuencias	
Genoma NCBI	Fuente de secuencias de referencia del genoma humano completo.

✓ **Métodos *In Sílico***

Por medio de estas herramientas bioinformáticas, fue posible predecir las consecuencias de las variantes genéticas en la estructura y función de las proteínas. Estas herramientas *in-silico* permiten determinar características como cambios en las propiedades físico-químicas de los aminoácidos sustituidos, el grado de conservación evolutiva, el entorno de la secuencia de un aminoácido afectado o la alteración en las propiedades estructurales de la proteína.

✓ **INTERVAR (<http://wintervar.wglab.org/about.php>)**

InterVar es una herramienta de software bioinformático para la interpretación clínica de variantes genéticas según la guía de American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) y la Association for Molecular Pathology (AMP) publicada en 2015 con estándares y las pautas actualizadas para la interpretación clínica de las variantes de secuencia con respecto a las EH, con base a clasificación de variantes : benigna, probable benigna, significancia incierta, probable patogénica y patogénica.

Además, InterVar desarrolló un servidor web complementario denominado wInterVar, para permitir la interpretación de variantes, es fácil de usar con un paso de interpretación automatizado y un paso de ajuste manual. Estas herramientas son especialmente útiles para tratar trastornos del desarrollo congénitos severos o de inicio muy temprano con alta penetrancia. Finalmente, utilizando los resultados de algunos estudios de secuenciación publicados, se ha demostrado la utilidad de InterVar para reducir significativamente el tiempo de interpretación de significancia clínica en las variantes de secuencia (129).

- **Polymorphism Phenotyping v2 (Polyphen-2)**

La herramienta Polyphen-2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/>) predice el impacto que puede causar una sustitución de un aminoácido en la estructura y/o función de una proteína humana mediante consideraciones comparativas. Dada una sustitución de un aminoácido en una proteína, PolyPhen-2 extrae varias características relacionadas con la secuencia y la estructura de donde se ha producido la sustitución e introduce estos datos en un clasificador probabilístico para obtener el grado de perjuicio que supone. Esta predicción se basa en reglas empíricas aplicadas a la secuencia, a la información filogenética y estructural que caracterizan la sustitución (130).

Usa el conjunto de datos HumDiv, que está formado por los alelos patogénicos causantes de enfermedades mendelianas que se encuentran en la base de datos UniProtKB, junto con las diferencias entre las proteínas humanas y sus

homólogos mamíferos más cercanos. Además, incluye datos de HumVar, formado por las mutaciones causantes de enfermedades humanas ubicadas en la base de datos UniProtKB y el conjunto nsSNPs (nonsynonymous single-nucleotide polymorphisms), sin enfermedades dañinas asociadas. Por medio de un clasificador Naïve Bayes, obtiene la probabilidad de que una mutación sea dañina dando una tasa o estimación de falsos positivos (posibilidad de que una mutación sea clasificada como perjudicial cuando en realidad no lo es) y verdaderos positivos (una mutación es clasificada como perjudicial y lo es).

Polyphen-2 clasifica a las variantes en una de estas tres categorías: benigna, probablemente patogénica y patogénica, basándose en la probabilidad de patogenicidad dada por el clasificador. La variante es considerada benigna cuando la probabilidad de patogenicidad es $< 0,15$. Las variantes serán consideradas posiblemente dañinas cuando la probabilidad de patogenicidad este entre 0,15 y 0,85. Por último serán considerada como probablemente dañina cuando la probabilidad de patogenicidad sea $> 0,85$. Además el programa da una estimación de falsos positivos y falsos negativos (130)

- **Mutation Taster** (<http://www.mutationtaster.org/>) (131)

Es una aplicación gratuita basada en la web para evaluar las variantes de secuencia de ADN para determinar su potencial de causar enfermedades. El Software realizara una batería de pruebas *in-silico* para estimar el impacto de la variante en el producto génico /proteína ; además de analizar las variantes missense, es capaz de analizar las variantes sinónimas, no codificantes y pequeñas inserciones no superiores a 12 bases. En función de estos tipos de variantes se utilizan tres diferentes modelos de predicción: Without_aae, diseñado para las variantes sinónimas y no codificantes que no conducen a sustitución de aminoácidos, pero podrían tener un efecto en el patrón de empalme de la transcripción; Simple_aae, para variantes missense; y Complex_aae, para las variantes con efecto más complejo como “framshifts” o proteínas truncadas.

Utiliza un clasificador Naïve Bayes para predecir el potencial patológico de una alteración, el cual ha sido preparado con datos de variantes recopilados de

diferentes fuentes. El conjunto de datos que contiene las variantes neutrales es una selección de SNPs e inserciones de dbSNP. La selección de SNPs se basa en las frecuencias de la población en Haplotype Map (HapMap), lo cual significa que la variante ha de encontrarse en al menos un 10% de la población. Este procedimiento de filtrado asegura que las variantes raras que podrían potencialmente causar enfermedades sean excluidas. Los datos de variantes asociadas a enfermedad se han obtenido a partir de Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), Human Gene Mutation Database (HGMD) y de la literatura.

Las características que han sido incluidas por el clasificador son: la conservación filogenética del lugar afectado, cambios en el sitio de splicing, pérdida en las características de la proteína, cambios en el RNAm así como en el tamaño de la proteína. Se introdujo en el programa informático la secuencia en formato FASTA, y a continuación, el cambio a estudiar, Mutation Taster clasifica a la variante como polimorfismo o como patogénica, basándose en la probabilidad de patogenicidad. Si la probabilidad está por debajo de 0,05 es clasificada como polimorfismo, si por el contrario está por encima se clasifica como patogénica. Además, da un valor (p) que refleja la seguridad de la predicción (131).

- **UMD PREDICTOR** (<http://umd-predictor.eu/analysis.php>) (132)

Es un sistema de predicción actualizado con significados clínicos de variantes génicas. Aproximadamente la mitad de las lesiones genéticas responsables de enfermedades hereditarias humanas se deben a una sustitución de aminoácidos. Distinguir las variaciones de secuencias neutrales de los responsables del fenotipo es de gran interés en la genética humana. Para diferenciar aún más las variantes neutrales de las sustituciones de nucleótidos patógenos, se desarrolló la nueva herramienta, UMD-Predictor. Esta herramienta proporciona un enfoque combinatorio, para identificar posibles variaciones patógenas, que asocia los siguientes datos: localización dentro de la proteína, conservación, propiedades bioquímicas de los residuos mutantes y de tipo salvaje, y el impacto potencial de la variación en el ARNm

UMD predictor es una plataforma independiente que contiene todas las predicciones de todas las sustituciones de cualquier transcripción humana. Fué conceptualizado como una arquitectura de tres niveles. El nivel de presentación se desarrolló en PHP, javascript y html. Esta interfaz integra las bibliotecas d3.js (<http://d3js.org/>) y jquery (<http://jquery.com/>) para garantizar un fácil acceso al sistema (<http://umd-predictor.eu>). El Nivel de aplicación integra el algoritmo de predicción en sí mismo y el nivel de datos integra la secuencia de referencia del genoma humano Ensembl v71 y las transcripciones. Todas las sustituciones teóricas de las transcripciones codificantes de proteínas (280,315,899 mutaciones) fueron modeladas, calculadas y almacenadas en una base de datos de PostgreSQL (<http://www.postgresql.org/>) que permite un análisis rápido de grandes conjuntos de datos.

Se pueden usar varios parámetros para buscar una sola o múltiples mutaciones, todas las mutaciones de un gen, transcripción o cromosoma específico y un archivo VCF completo. Además, el sitio web proporciona materiales educativos para facilitar la experiencia del usuario. Actualmente se cataloga como uno de los mejores sistemas de predicción, teniendo gran nivel de especificidad y sensibilidad con respecto a otras plataformas (132).

- **PROVEAN** (Protein Variation Effect Analyzer) (133)

Es una herramienta útil para filtrar variantes de secuencia para identificar variantes no sincronizadas o indel que se predice que son funcionalmente importantes. El rendimiento de PROVEAN es comparable a las herramientas populares como SIFT o PolyPhen-2. Por medio de un método de cálculo rápido para obtener puntuaciones de alineación de secuencia por pares, permite la generación de predicciones pre-calculadas para 20 sustituciones de aminoácidos únicos y una eliminación en aminoácidos individuales en cada posición de todas las secuencias de proteínas tanto en humanos como en ratones.

El software es capaz de calcular una puntuación de alineación delta para cada secuencia de soporte. Los puntajes se promedian luego dentro y entre los grupos

para generar el puntaje final. Si la puntuación es igual o por debajo de un umbral predefinido (por ejemplo, -2.5), se predice que la variante de la proteína tendrá un efecto "Patogénico". Si la puntuación está por encima del umbral, se predice que la variante tendrá un efecto "neutral o benigno".

- **Algoritmo SIFT (<http://sift.jcvi.org/>)**

Es una herramienta que clasifica las sustituciones de aminoácidos en una proteína dada y predice si estos cambios provocarán un efecto fenotípico en la misma. SIFT se basa en la premisa de que los aminoácidos importantes de una proteína están conservados en la evolución, por lo que cambios en los mismos deben afectar a la funcionalidad de la proteína. Con una secuencia proteica dada, SIFT escoge proteínas relacionadas y obtiene un alineamiento múltiple de estas con la proteína a analizar, y basándose en los aminoácidos presentes en cada posición del alineamiento realiza una predicción de las sustituciones que afectarán a la función de la proteína. Las sustituciones en una posición conservada en el alineamiento serán consideradas como "no tolerables" para la mayoría de los cambios, mientras que las posiciones que no están conservadas en el alineamiento tolerarán mejor los cambios de aminoácido.

Se introduce la secuencia a analizar en formato FASTA y el programa primero busca secuencias similares a la introducida por nosotros, después escoge secuencias estrechamente relacionadas que puedan tener una función similar a la nuestra, y luego obtiene el alineamiento de las secuencias escogidas. Por último, calcula las probabilidades normalizadas para todas las posibles sustituciones del alineamiento. Las sustituciones con una puntuación menor de 0,05 serán clasificadas como deletéreas, y las de puntuación mayor o igual a 0,05 serán tolerables o neutrales (134)

- **Human Splicing Finder**

Es una herramienta para predecir los efectos de las mutaciones en las señales de empalme o para identificar motivos de empalme en cualquier secuencia humana. Contiene todas las matrices disponibles para la predicción de secuencias auxiliares, así como las nuevas para los sitios de unión de las

proteínas 9G8 y Tra2-beta Serina-Arginina y la ribonucleoproteína hnRNP A1. También tiene nuevas matrices de peso de posición para evaluar la resistencia de los sitios de empalme de 5' y 3' y los puntos de ramificación. HSF podría ser un recurso valioso para fines de investigación, diagnóstico y terapéuticos (por ejemplo, omisión de exón terapéutico), así como para estudios globales, como el Proyecto Europeo GEN2PHEN o el Proyecto Varioma Humano (135).

Clasificación de variantes de acuerdo con American College of Medical Genetics (ACMG) :

La evaluación de la evidencia de una variante está destinada a la interpretación de variantes observadas en pacientes con presuntos trastornos hereditarios (principalmente mendelianos) en un entorno de laboratorio de diagnóstico clínico. Por esta razón el colegio americano de genética médica (ACMG por sus siglas en inglés) ha instaurado un sistema de clasificación dependiendo de las investigaciones reportadas en diferentes estudios, análisis familiares , *in-silico* y predicciones sistemáticas que permitan un acuerdo de interpretación en variantes (136,137) .

Dicho sistema del ACMG se ha clasificado para obtener información sobre la significancia clínica de la siguiente manera:

- **Patogénica:** variantes que tienen evidencia fuerte de asociación con enfermedad.
- **Probablemente Patogénica:** variantes que probablemente están implicadas con enfermedad, ya que el cambio nucleotídico presenta una probabilidad de más del 90% de ser patogénica.
- **De significado incierto (VUS):** variantes con posibles cambios funcionales, pero con evidencia contradictoria o insuficiente. Es decir no se puede definir si es patogénica o no.
- **Probablemente benigna:** variantes con evidencia que sugiere benignidad, pero con datos débiles en la literatura que no descartan impacto biológico y eventualmente clínico. El cambio nucleotídico presenta una probabilidad de más del 90% de no ser patogénica.
- **Benigna:** variantes genéticas que no alteran funcionalidad.

5.4 CÁLCULO DE FRECUENCIAS ALÉLICAS

Al total de 320 exomas completos registrados y pertenecientes al Big Data del Instituto de Genética Médica – GENOMICS (Cali), se le buscaron las variantes en el gen *GBA*; cada una de las variantes encontradas se tabuló según su posición, cambio de nucleótido, cambio de aminoácido, significado clínico, frecuencia alélica y referencia en NCBI.

La frecuencia alélica se calculó por cuenta simple (138):

$$FA = \frac{\text{Número de copias del Alelo en la población}}{\text{Número total de copias del gen en la población}}$$

5.5 RED DE INTERACCIÓN DE GENES ASOCIADOS A *GBA*

Se realizaron redes de interacción para el gen *GBA*, utilizando los software STITCH 5 (<http://stitch.embl.de/>) y GeneMANIA con proteínas asociadas y moléculas pequeñas, teniendo en cuenta solamente la evidencia encontrada de experimentos, bases de datos proceso biológico, función molecular, ruta o dominio de la proteína que se veía alterada y co-expresión con un nivel de confianza de 0.900 para determinar interacción entre genes cercanos.

STITCH 5 es una base de datos de interacciones conocidas y previstas entre productos químicos y proteínas. Las interacciones incluyen asociaciones físicas y funcionales; provienen de la predicción computacional, de la transferencia de conocimiento entre organismos y de interacciones agregadas de otras bases de datos. La base de datos STITCH actualmente cubre 9'643'763 proteínas de 2'031 organismos. Las interacciones en STITCH se derivan de cinco fuentes principales: Predicciones del contexto genómico, experimentos de laboratorio de alto rendimiento, co-expresión, minería de texto automatizada, conocimientos previos en bases de datos. (139,140)

GeneMANIA es un sitio web flexible y fácil de usar para generar hipótesis sobre la función de genes, analizar listas de genes y priorizar genes para ensayos

funcionales. Dada una lista de genes de consulta, GeneMANIA encuentra genes funcionalmente similares utilizando una gran cantidad de datos de genómica y proteómica. En este modo, pondera cada conjunto de datos genómicos funcionales de acuerdo con su valor predictivo para la consulta. Otro uso de GeneMANIA es la predicción de la función genética. Dado un solo gen de consulta, GeneMANIA encuentra genes que probablemente compartan funciones con él en función de sus interacciones con él. Se han recopilado cientos de conjuntos de datos y cientos de millones de interacciones de GEO, BioGRID, IRefIndex e I2D, así como conjuntos de datos de genómica funcionales específicos de organismos. Actualmente la red se realiza teniendo en cuenta la evidencia encontrada de experimentos, bases de datos proceso biológico, función molecular, ruta o dominio de la proteína que se veía alterada y co-expresión con un nivel de confianza de 0.900, utilizado este valor por que representa gráficamente la expresión del fenómeno y no de las exclusiones. (<http://genemania.org>) (141).

6. CONSIDERACIONES ÉTICAS

De acuerdo con el artículo 11 de la Resolución 8430 de 1993 del Ministerio de Salud Colombiano, este trabajo se consideró como una Investigación con riesgo mínimo, ya que es un estudio que utilizó una base de datos provenientes del Instituto de Genética Médica – GENOMICS (Cali), en donde se encuentra consignada la información de los exomas de pacientes con patologías diferentes y no diagnosticados clínicamente con enfermedad de Gaucher del Suroccidente Colombiano.

Se preservó la confidencialidad de los datos por medio de la asignación de un código alfa numérico a cada paciente, el cual reemplazó sus datos de identidad, impidiendo así su individualización por fuera del estudio. Además, contó con consentimiento- Asentimiento informado por parte de los participantes.

Aspectos éticos : El presente proyecto tuvo en cuenta

- Protección de personas y animales: Los autores declaran que los procedimientos seguidos se conformaron a las normas éticas de comité de experimentación humana responsable y se adapta a los principios

establecidos en la Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial (AMM)

- Confidencialidad de los datos: Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes y han seguido los protocolos de su centro de trabajo.
- Derecho a la privacidad y consentimiento informado: Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes y se obtuvo consentimiento informado por parte del representante legal (padre y madre) de la paciente

Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial “Principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos” en donde se consideran como aspectos fundamentales para el cumplimiento de los objetivos de manera profesional y disciplinar (142). Dentro de estos se destacan para este proyecto:

...2. El deber del médico es promover y velar por la salud de las personas. Los conocimientos y la conciencia del médico han de subordinarse al cumplimiento de este deber.

...5. En investigación médica en seres humanos, la preocupación por el bienestar de los seres humanos debe tener siempre primacía sobre los intereses de la ciencia y de la sociedad.

...6. El propósito principal de la investigación médica en seres humanos es mejorar los procedimientos preventivos, diagnósticos y terapéuticos, y también comprender la etiología y patogenia de las enfermedades. Incluso, los mejores métodos preventivos, diagnósticos y terapéuticos disponibles deben ponerse a prueba continuamente a través de la investigación para que sea eficaz, efectivo, accesible y de calidad.

...9 Los investigadores deben conocer los requisitos éticos, legales y jurídicos para la investigación en seres humanos en sus propios países, al igual que los requisitos internacionales vigentes. No se debe permitir que un requisito ético, legal o jurídico disminuya o elimine cualquier medida de protección para los seres humanos establecida en esta Declaración.

Principios básicos para toda investigación médica.

...10. En la investigación médica, es deber del médico proteger la vida, la salud,

la intimidad y la dignidad del ser humano.

...14. El protocolo de la investigación debe hacer referencia siempre a las consideraciones éticas que fueran del caso, y debe indicar que se han observado los principios enunciados en esta Declaración.

...20. Para tomar parte en un proyecto de investigación, los individuos deben ser participantes voluntarios e informados.

...21: Siempre debe respetarse el derecho de los participantes en la investigación a proteger su integridad. Deben tomarse toda clase de precauciones para resguardar la intimidad de los individuos, la confidencialidad de la información del paciente y para reducir al mínimo las consecuencias de la investigación sobre su integridad física y mental y su personalidad.

...22. En toda investigación en seres humanos, cada individuo potencial debe recibir información adecuada acerca de los objetivos, métodos, fuentes de financiamiento, posibles conflictos de intereses, afiliaciones institucionales del investigador, beneficios calculados, riesgos previsibles e incomodidades derivadas del experimento. La persona debe ser informada del derecho de participar o no en la investigación y de retirar su consentimiento en cualquier momento, sin exponerse a represalias. Después de asegurarse de que el individuo ha comprendido la información, el médico debe obtener entonces, preferiblemente por escrito, el consentimiento informado y voluntario de la persona. Si el consentimiento no se puede obtener por escrito, el proceso para obtenerlo debe ser documentado formalmente antes testigos.

...27. Tanto los autores como los editores tienen obligaciones éticas. Al publicar los resultados de su investigación, el médico está obligado a mantener la exactitud de los datos y resultados. Se deben publicar tanto los resultados negativos como los positivos o de lo contrario deben estar a la disposición del público. En la publicación se debe citar la fuente de financiamiento, afiliaciones institucionales y cualquier posible conflicto de intereses.

CÓDIGO DE NUREMBERG Tribunal Internacional de Núremberg, 1947 (143)

1) El consentimiento voluntario del sujeto humano es absolutamente esencial

El experimento debe realizarse con la finalidad de obtener resultados fructíferos para el bien de la sociedad que no sean asequibles mediante otros métodos o medios de estudio, y no debe ser de naturaleza aleatoria o innecesaria.

Además se tuvo en cuenta entre todos con mayor énfasis otros principios medico legales como son el evitar todo sufrimiento o daño innecesario físico o mental. No debe realizar experimento alguno cuando hay una razón a priori para suponer que puede ocurrir la muerte o una lesión irreparable; excepto, quizá, en los experimentos en los que los médicos investigadores son también sujetos de experimentación.

PRINCIPIOS BIOETICOS UNIVERSALES (144)

En esta investigación se tuvo en cuenta la relevancia en la aplicación de los principios bioético-universales de Autonomía, beneficencia, no maleficencia y justicia y de este modo aportar a la comunidad científica y sociedad en general.

INFORME BELMONT (145)

Se tuvo presente para la definición de metodología, consentimiento informado y cumplimiento de objetivos de esta investigación los *Principios y guías éticos para la protección de los sujetos humanos de investigación*, ya que dentro de otros aspectos se considera relevante brindar la oportunidad de elegir a quienes participen del mismo, lo que les pueda ocurrir o no, además estableciendo con claridad que no hay riesgos en su bienestar.

DECLARACIÓN UNIVERSAL DEL GENOMA HUMANO (146):

- LA DIGNIDAD HUMANA Y EL GENOMA HUMANO.

Se ha tenido en cuenta los principios rectores para la práctica de investigación la cual relacionada con parte del genoma teniendo en cuenta el respeto por la dignidad de los pacientes y sus familias y que los beneficios no sean diferentes a los académicos.

De los principios a la práctica:

- Artículo 1 El genoma humano es la base de la unidad fundamental de todos los miembros de la familia humana y del reconocimiento de su dignidad intrínseca y su diversidad. En sentido simbólico, el genoma

humano es el patrimonio de la humanidad.

- Artículo 2 a) Cada individuo tiene derecho al respeto de su dignidad y derechos, cualesquiera que sean sus características genéticas. b) Esta dignidad impone que no se reduzca a los individuos a sus características genéticas y que se respete el carácter único de cada uno y su diversidad.
- Artículo 3 El genoma humano, por naturaleza evolutivo, está sometido a mutaciones. Entraña posibilidades que se expresan de distintos modos en función del entorno natural y social de cada persona, que comprende su estado de salud individual, sus condiciones de vida, su alimentación y su educación.
- Artículo 4 El genoma humano en su estado natural no puede dar lugar a beneficios pecuniario.

7. RESULTADOS

- Determinación de variantes genómicas en GBA

En los resultados de los 320 exomas de pacientes con diferentes patologías y no diagnosticados con EG se encontraron 41 variantes asociadas al gen *GBA* (Tabla 3) . 14 de dichas variantes no habían sido reportadas (NR) previamente en bases de datos genéticas, poblacionales e *in-silico* por lo que únicamente fue posible anotar los datos de cambio de posición. 17 variantes encontradas constituyeron cambios de tipo *missense* donde se produjo un cambio en un único nucleótido provocando la aparición de un codón que codificaba un aminoácido diferente y 5 variantes constituyeron cambios sinónimos, por lo que se codifica el mismo aminoácido con diferente nucleótido en la conformación.

Con respecto a los cambios mutacionales en nucleótidos, los de tipo transicional (G>A; C>T; AG) se reportaron en un 41.4% de las variantes encontradas, mientras que los cambios de tipo transversional (G>C; T>A; A>C; C>A; C>G; G>T) se encontraron en un 58% de la muestra. El cambio transicional C>T se reportó en un 17% del total de variantes y el cambio transversional C>A se encontró en un 26,% del total de variantes (Figura 4).

Se encontraron también 4 variantes que se ubican en regiones intrónicas del gen *GBA* (c.761+42A>C; c.762-18T>A; c.1225-34C>A; c.1000-81A>C) todas estas se encuentran reportadas en la base de datos Clinvar con significancia clínica Benigna (Figura 5).

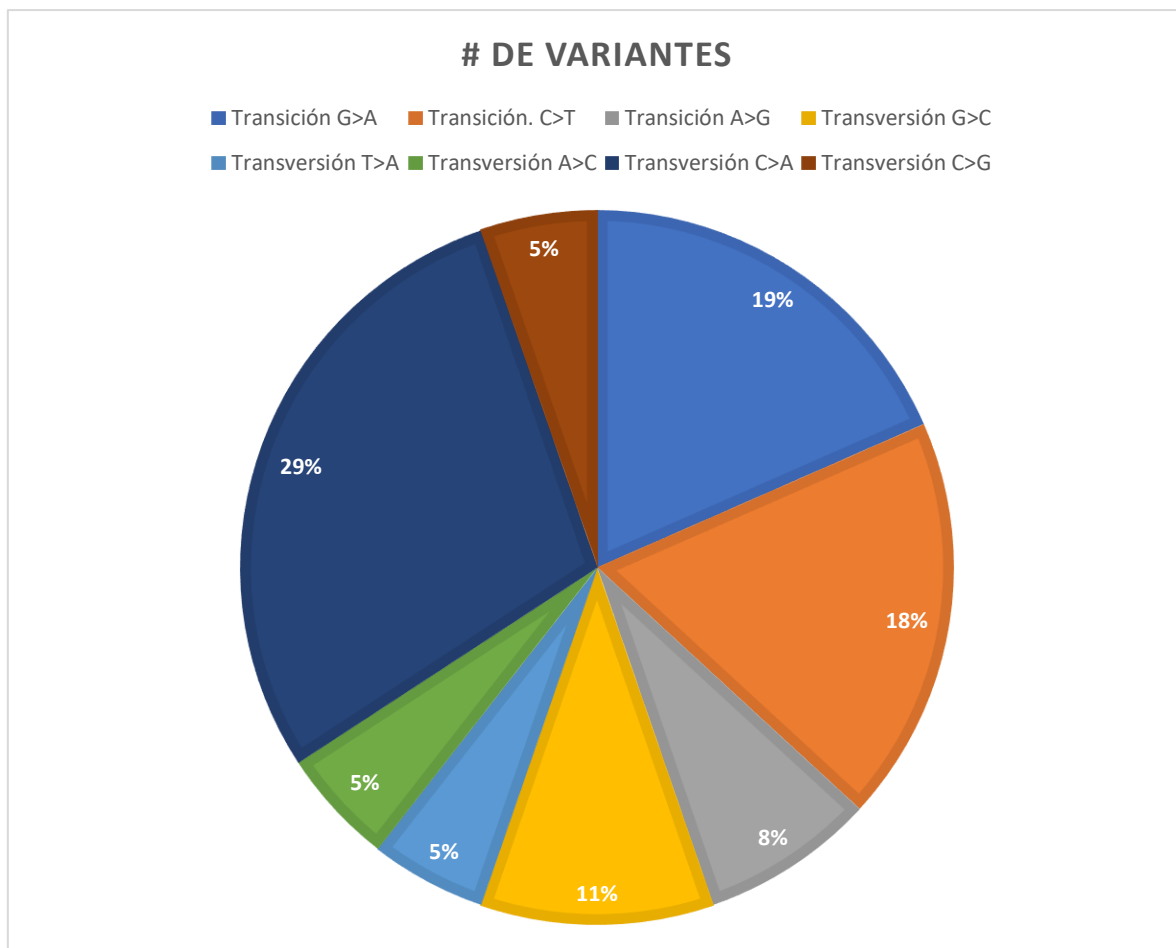


Figura 4 . Porcentaje de cambios transicionales y transversionales encontrados en el gen *GBA* en pacientes con patologías diferentes y no diagnosticados con EG

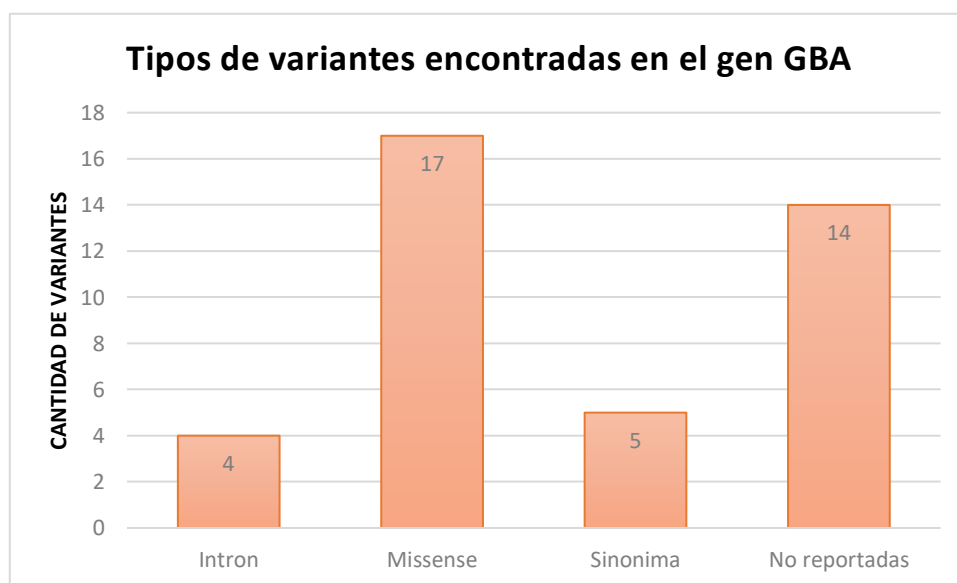


Figura 5. Tipos de variantes encontradas en el gen *GBA* en pacientes con patologías diferentes y no diagnosticados con EG

Gen	Posición	Cambio de nucleótido	Cambio de A.A	Referencia Clinvar	Significado Clínico-Clinvar	Tipo de Cambio	Human Splicing Finder	UMD-Predictor	Polyphen	Provean	SIFT	Mutation Taster	Frecuencia alélica
GBA	Chr1: 155209360	c.454+47G>A	-	rs2075569	Benigno	misense	benigna	NR	NR	benigna	NR	Benigna	0,9037
GBA	Chr1: 155210498	c.38A>G	p.Lys13Arg	rs150466109	Benigno	misense	benigna	benigna	benigna	benigna	benigna	Benigna	0,5407
GBA	Chr1: 155204793	c. G>A	p. Arg496His	rs80356773	Benigno	misense	benigna	benigna	benigna	benigna	benigna	Benigna	0,009
GBA	Chr1: 155236246	c.1223C>T	p.Thr408Met	rs75548401	Benigno	misense	Benigna	benigna	benigna	benigna	benigna	Benigna	0,05
GBA	Chr1: 155237596	c.762-18T>A	-	rs140335079	Benigno	Intron	Benigna	NR	NR	NR	NR	Benigna	0,0156
GBA	Chr1: 155205018	c.1473C>T	p.Pro491=	rs149257166	Benigno	Sinonima	Benigna	benigna	NR	benigna	benigna	Benigna	0,0156
GBA	Chr1: 155238092	c.761+42A>C	-	rs558529804	Benigno	Intron	Benigna	NR	NR	NR	NR	Benigna	0,0218
GBA	Chr1: 155240025	c.168C>T	p.Val56=	No reportado	Benigno	Sinonima	Benigna	NR	NR	benigna	benigna	Benigna	0,009
GBA	Chr1: 155235878	c.1225-34C>A	-	rs3115534	Benigno	Intron	Benigna	NR	NR	NR	NR	Benigna	0,0156
GBA	Chr1: 155236417	c.1052G>C	p.Trp351Ser	rs1553217294	Benigno	Misense	Benigna	benigna	benigna	benigna	benigna	Benigna	0,009
GBA	Chr1: 155235217	c.1483G>C	p.Ala495Pro	rs368060	Benigno	Misense	Benigna	benigna	benigna	benigna	benigna	Benigna	0,0156
GBA	Chr1: 155238290	c.605G>A	p.Arg202Gln	rs398123531	Benigno	Misense	Benigna	benigna	benigna	benigna	benigna	Benigna	0,0156
GBA	Chr1: 155235203	c.1497G>C	p.Val499=	rs1135675	Benigno	Sinonima	Benigna	benigna	NR	benigna	benigna	Benigna	0,0156
GBA	Chr1: 155205047	c.1444G>A	p.Asp482Asn	rs75671029	Probablemente patológico	Misense	Benigna	patogénica	patogénica	benigna	benigna	Benigna	0,009
GBA	Chr1: 155235253	c.1447C>T	p.Leu483=	rs369966551	Benigno	Sinonima	Benigna	benigna	NR	benigna	benigna	Benigna	0,0156
GBA	chr1: 155205060	c.1431C>G	p.Ala477Ala	-	Benigna	Sinonima	Benigna	benigna	NR	benigna	benigna	Benigna	0,0156
GBA	Chr1: 155178782	c.187T>A	Ser63Thr	rs760077	No reportado	Misense	NR	NR	NR	NR	NR	NR	0,218
GBA	Chr1: 155209725	c.259C>T	p.Arg87Trp	rs1141814	Patogénico	Misense	patogénica	patogénica	patogénica	benigna	patogénica	NR	0,009
GBA	Chr1: 155239972	c.221G>C	p.Gly74Ala	rs371592589	Significado incierto	5 prime UTR	Probablemente patológica	Probablemente benigna	Probablemente benigna	benigna	patogénica	NR	0,0156
GBA	Chr1: 155239946	c.247C>T	p.Arg83Cys	No reportado	Significado incierto	Misense	patogénica	patogénica	patogénica	patogénica	patogénica	Patogénica	0,0062

GB A	Chr 1: 155236550	c.1000- 81A>C	-	rs9628662	Benigno	Intrón	Benigna	NR	NR	NR	NR	Benign a	0,009
GB A	Chr 1 : 155238226	c.669G>T	p.Trp223Cy s	rs155790486 0	Significado incierto	Misenss e	patogénica	patogénica	patogénica	patogénic a	patogénic a	NR	0,0062
GB A	Chr1 :155240707	c.38A>G	p.Lys13Arg	rs150466109	Significado incierto	Misenss e	Benigna	benigna	benigna	benigna	benigna	Benign a	0,037
GB A	Chr 1: 155240687	c.58A>G	p.Ile20Val	rs143187997	Benigno	Misenss e	Benigna	benigna	benigna	benigna	benigna	Benign a	0,0156
GB A	Chr1: 155237505	c.835C>G	p.Leu279Va l	rs105751902 0	Significado incierto	Misenss e	Benigna	benigna	benigna	benigna	benigna	Benign a	0,0156
GB A	Chr1 : 155236439	c.1030G>A	p.Val344Ile	rs794727963	Significado incierto	Misenss e	Benigna	benigna	benigna	benigna	benigna	Benign a	0,0156
GB A	Chr1: 155240059	c.134C>T	p.Pro45Leu	rs155321837 7	Significado incierto	Misenss e	patogénica	patogénica	patogénica	patogénic a	benigna	Benign a	0,0218
GB A	Ch1: 155218003	C>A	No reportado	No reportado	No reportado	No reportad o	NR	NR	NR	NR	NR	NR	0,0156
GB A	Chr1: 155206311	C>A	No reportado	No reportado	No reportado	No reportad o	NR	NR	NR	NR	NR	NR	0,009
GB A	Chr 1: 155217606	G>A	No reportado	No reportado	No reportado	No reportad o	NR	NR	NR	NR	NR	NR	0,009
GB A	Chr1: 155218088	C>A	No reportado	No reportado	No reportado	No reportad o	NR	NR	NR	NR	NR	NR	0,0156
GB A	Chr1 : 155217679	C>A	No reportado	No reportado	No reportado	No reportad o	NR	NR	NR	NR	NR	NR	0,0156
GB A	Chr 1 :155207876	G>A	No reportado	No reportado	No reportado	No reportad o	NR	NR	NR	NR	NR	NR	0,0667
GB A	Chr1: 155205669	G>T	No reportado	No reportado	No reportado	No reportad o	NR	NR	NR	NR	NR	NR	0,6296
GB A	Chr1 :155209911	C>A	No reportado	No reportado	No reportado	No reportad o	NR	NR	NR	NR	NR	NR	0,037
GB A	Chr1 :155218093	C>A	No reportado	No reportado	No reportado	No reportad o	NR	NR	NR	NR	NR	NR	0,009

GB A	Chr 1:155218076	C>A	No reportado	No reportado	No reportado	No reportad o	NR	NR	NR	NR	NR	NR	0,0156
GB A	Chr1:15521803 9	C>A	No reportado	No reportado	No reportado	No reportad o	NR	NR	NR	NR	NR	NR	0,009
GB A	Chr1: 155217752	C>A	No reportado	No reportado	No reportado	No reportad o	NR	NR	NR	NR	NR	NR	0,0156
GB A	Chr1: 155217709	C>A	No reportado	No reportado	No reportado	No reportad o	NR	NR	NR	NR	NR	NR	0,218
GB A	Chr1 : 155218007	G>T	No reportado	No reportado	No reportado	No reportad o	NR	NR	NR	NR	NR	NR	0,0156

NR: No reportado

Tabla 3. Variantes del gen *GBA* en 320 pacientes del suroccidente colombiano. Contiene información sobre cambios de nucleótidos, aminoácidos, código clinvar, significado clínico de acuerdo con diversas herramientas bioinformáticas.

- Caracterización de variantes con respecto a ACMG

Con respecto a la significancia clínica clasificada por el ACMG y de acuerdo con los softwares de predicción utilizados, el 51.2% (21 variantes) presentaron una significancia benigna, el 12% (5 variantes) obtuvo una clasificación patogénica o probablemente patogénica y el 19% presentó significancia incierta; en este último caso, por medio de análisis *in-silico* se logró reclasificar algunas de estas variantes, obteniendo de esta manera 3 variantes patogénicas y 3 benignas. El 36 % restante no han sido reportadas a manera funcional, por lo que se desconoce al momento su significancia clínica.

De acuerdo con estos resultados, si los análisis realizados no han detectado ninguna variante patogénica o solamente variantes genéticas de significado incierto, es importante establecer plazos de revisión para valorar la posible reclasificación de las variantes reportadas.

- Cálculo de frecuencia alélica

De acuerdo con las frecuencias alélicas analizadas, la variante c.454+47G>A presentó la frecuencia más alta, encontrándose en el 90,37% de las muestras obtenidas; dicha variante fue evaluada y se reportó que en 5 de 6 predictores bioinformáticos presentó una significancia clínica benigna, por lo que de acuerdo con estos valores no genera una afección en la proteína ; así mismo, la variante p. Lys13Arg (c.38A>G) se encontró con una frecuencia del 54% en las muestras y de acuerdo con 6 predictores presenta una significancia clínica benigna, por lo que se reportó que las variantes con frecuencias alélicas más altas son aquellas de significancia clínica benigna.

Por su parte, las variantes que de acuerdo con los software de predicción se clasificaron como patogénicas o probablemente patogénicas (c.1444G>A p. Asp482Asn; c.259C>T p. Arg87Trp; c.247C>T p. Arg83Cys; c.669G>T p.Trp223Cys; c.134C>T p.Pro45Leu) presentaron una frecuencia alélica que osciló entre 0,0062 y 0,0218, siendo 0,0062 la menor frecuencia alélica reportada en los datos encontrados; al buscarlas en bases de datos poblacionales como

1.000 Genomas, ExAC y gnomAD se encontró que la variante c.1444G>A se ha reportado previamente, oscilando frecuencias entre 0.002 y 0.0006, y la variante c.259C>T con frecuencias de 0.00003 como máximo, las otras 3 variantes registradas no han sido reportadas previamente en estas bases de datos (Tabla 4).

Variante patogénica en GBA	FA en el presente trabajo	FA en 1000 Genomas	FA en ExAC	FA en gnomAD
c.1444G>A (p.Asp482Asn)	0,009	0.00240	0.00069	0.00217
c.259C>T (p. Arg87Trp)	0.009	NR	0.00002	0.00003
c.247C>T (p. Arg83Cys)	0.0062	NR	NR	NR
c.669G>T (p.Trp223Cys)	0.0062	NR	NR	NR
c.134C>T (p.Pro45Leu)	0.0218	NR	NR	NR

FA : Frecuencia Alelica NR: No reportado

Tabla 4. Relación de frecuencias alélicas encontradas en variantes patogénicas del gen GBA en 320 exomas y bases de datos poblacionales.

- **Predicción de interacciones entre GBA y otros genes-moléculas**

La red de interacción génica construida en el programa GeneMania, permitió observar redes basadas en interacciones físicas (línea rosa), co-expresión (línea morada), predicción de asociaciones (línea naranja) e interacciones genéticas (línea verde) que se ubican entre el gen *GBA*, los genes *PSAP*, *SCARB2* y *LAMP2* y a su vez 17 genes que pueden interactuar entre ellos de una manera más leve en cuanto a funcionamiento.

Se observó una fuerte interacción física entre el gen *GBA* y el gen *PSAP*, relacionándose con funciones celulares pertenecientes a la membrana lisosomal (morado), membrana vacuolar (verde), lumen vacuolar (amarillo) y lumen lisosomal (azul) (Figura 6). El funcionamiento de estos dos genes impacta también en la coexpresión de genes como *LAMP1*, *MAN2B1*, *PCBP2*, *HYOU1*, los cuales no comparten asociación en la función celular relacionada con *GBA* de acuerdo con la red.

Así mismo, se reportó una fuerte interacción física y coexpresiva entre el gen *GBA* y *SCARB2*, compartiendo las mismas funciones celulares encontradas con el gen *PSAP*. El funcionamiento de estos dos genes impacta en la interacción física relacionada con el gen *LAMP2*, el cual expresa funciones celulares relacionadas con la membrana vacuolar (verde), la membrana lisosomal (morado), y las partes vacuolares (lila). Además, se encuentra una co-expresión genica derivada del funcionamiento de *SCARB2* en los genes *JUN*, *RPS6KA3*, *ZMYND11* y *NEDD4*.

En un grupo restante de 13 genes, aunque se presentaron interacciones físicas, de co-expresión y predicción con *GBA*, *PSAP* y *SCARB2*, no se logró establecer una similitud en cuanto a la función específica de estos en la red de interacción basada en *GBA*.

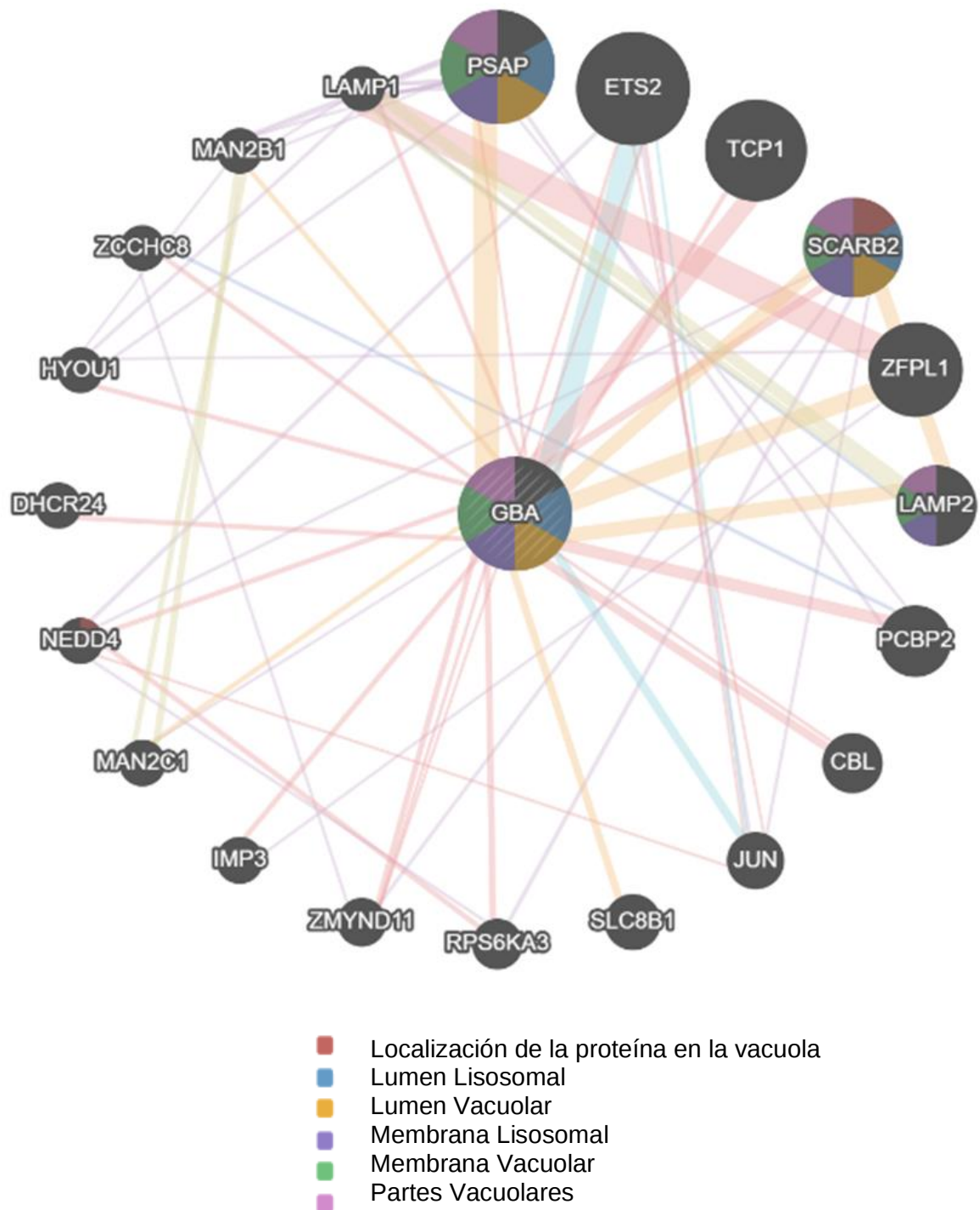


Figura 6. Red de interacción entre el gen *GBA* y genes asociados. Generado con el programa GeneMania

Por su parte, la red obtenida con el programa STITCH 5 permitió determinar 5 nodos de genes relacionados con procesos biológicos del gen *GBA* que permite realizar funciones asociadas con procesos catabólicos y metabólicos de la glucosilceramida, y procesos metabólicos de esfingosinas, funciones moleculares asociadas con la actividad beta-galactosidasa e hidrolasa que afectan componentes celulares como el lumen lisosomal (Figura 7).

Esta red refuerza la asociación cercana entre *GBA* y los genes *PSAP*, *SCARB2* y *LAMP2* reportada previamente en GeneMania; con *PSAP* que codifica para la Prosaposina, se reporta una interacción de 0.977 que involucra la actividad hidrolasa y beta galactosidasa de ambos genes, además de relacionarse con funciones de la glucosilceramida en las células.

La red de interacción muestra también con líneas verdes, toda relación con fármacos o componentes farmacológicos que alteran o promueven el funcionamiento del gen *GBA* y que se han utilizado en algún momento para el tratamiento de la EG. Entre ellos, se destaca la interacción con Miglustat e Isofagomina. Miglustat (OGT 918, "N" -butil-desoxinojirimicina) es un fármaco desarrollado por Oxford GlycoSciences y comercializado por Actelion que se utiliza principalmente para tratar la EG1 y que se comercializa con el nombre comercial Zavesca; por su parte, Isofagomina, también conocido como Afegostat (nombre comercial planificado Plicera) era un fármaco experimental para el tratamiento de ciertas formas de EG, que estaba siendo desarrollado por Amicus Therapeutics y Shire plc hasta que un ensayo clínico fallido en 2009 llevó a la finalización de su desarrollo.

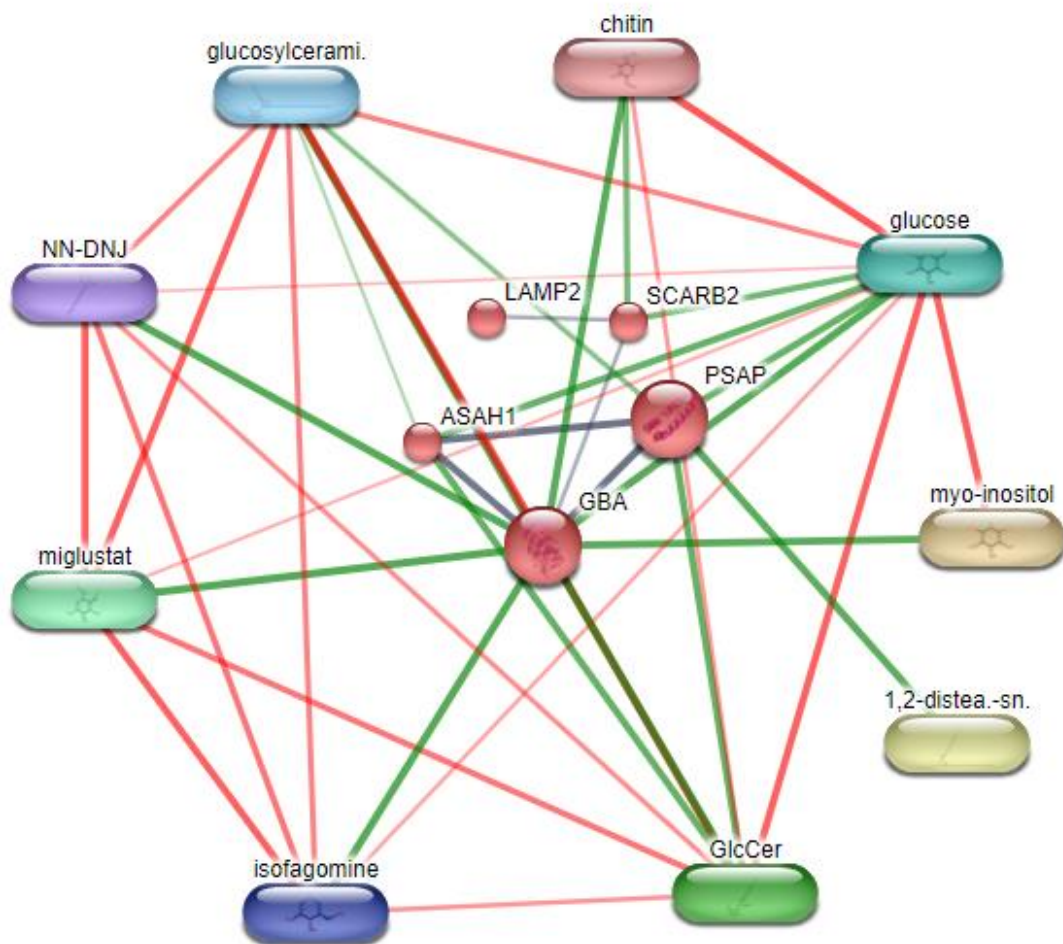


Figura 7. Esquema de red de interacción génica asociada al gen *GBA* con el programa STITCH 5

8. DISCUSIÓN

La EG es un trastorno hereditario poco común causado por una deficiencia de la enzima lisosomal β -glucocerebrosidasa codificada por el gen *GBA*; se caracteriza por la acumulación de glucosilceramida, en los lisosomas de las células del sistema monocito-macrófago, lo que conduce a manifestaciones de enfermedad multisistémica que incluyen esplenomegalia, hepatomegalia, trombocitopenia, anemia y enfermedad ósea (147;148). Desde que se introdujeron las TRE y TRS, han demostrado ser efectivas para prevenir y reducir las manifestaciones sistémicas y algunas complicaciones de la EG1, como hepatomegalia, esplenomegalia, citopenia, retraso del crecimiento y algunas enfermedades óseas y por el contrario, la demora en el diagnóstico y el acceso a un tratamiento adecuado pueden aumentar potencialmente el riesgo de complicaciones irreversibles (149;150). Por esta razón realizar este tipo de estudios en donde se abordan todas las posibles variantes que se puedan encontrar en el gen *GBA* ayudan en el tamizaje y diagnóstico temprano de la EG.

En los resultados de los exomas completos de 320 pacientes con patologías diferentes y no diagnosticados clínicamente de EG, se encontraron 41 variantes del gen *GBA*; 21 de ellas con significancia clínica benigna y 5 con significancia clínica patogénica; además se informaron 15 variantes que no habían sido reportadas previamente dentro de la bibliografía. En cuanto a los tipos de cambio nucleotídico, no se encontró una tendencia, en términos poblacionales de fijación de mutaciones transicionales o transversionales en las variantes del gen *GBA* en esta población estudiada, a diferencia de lo que ocurre en otras enfermedades de depósito lisosomal como la mucopolisacaridosis tipo II, en donde se ha reportado la fijación de mutaciones transicionales de tipo C>T, probablemente relacionada con mecanismos de compensación de sesgos en la inactivación del cromosoma X en humanos (151).

Esto resalta la importancia de esta investigación, en pro de la clasificación patológica de las variantes y los posibles efectos que se pueden encontrar dentro de la funcionalidad de la proteína.

Las variantes descritas en las poblaciones afectadas alrededor del mundo parecen indicar que la región donde se localiza una mayor cantidad de variantes se encuentra entre los exones 8, 9 y 10 (58; 59). De todas las variantes descritas en el gen *GBA*, sólo unas 120 se han asociado a fenotipos de EG; aproximadamente 70 al tipo 1, 43 al tipo 2 y 8 al tipo 3 (59), sin establecerse alguna región génica o dominio donde ocurran de manera preferencial y la distribución étnica y geográfica de cada mutación pueden variar significativamente (62;63). Aproximadamente el 70% de todas las sustituciones informadas, incluidas las dos sustituciones patogénicas más comunes, p. N370S y p. L444P, se encuentran en los exones 9-10 del gen *GBA* (64)

Las diferentes variantes pueden estar más representadas en grupos étnicos particulares, así como en fenotipos particulares. La primera variante reportada en EG fué p. Leu483Pro (65). La más común identificada en los pacientes rumanos es p. Asn409Ser (66). La más común entre los pacientes AJ es c.1226A <G (N370S; o N409S según la nueva nomenclatura) seguida de c.84dupG (84GG), que es más rara (67). El cambio c.115 + 1G> A (IVS2 + 1), c.1504C> T (R463C) y c.1604G> A (R496H) se encuentran comúnmente en pacientes AJ con EG1. Por el contrario, la mutación N370S rara vez se encuentra entre pacientes chinos y japoneses. (60).

Entre los grupos étnicos asiáticos, c.1448T> C (L444P o L483P según la nueva nomenclatura) y c.754T> A (F252I), generalmente asociado con EG2 y 3, son más prevalentes, y también explican por qué entre estas poblaciones, las formas neuropáticas de EG son más frecuentes (152). c.1448T> C (L444P) es también la mutación más frecuente entre los caucásicos con ascendencia judía no Ashkenazi (11).

De las 5 variantes con significancia clínica patogénica encontradas en este trabajo:

El cambio c.1444G>A p.Asp482Asn presentó una frecuencia alélica del 0,009; hasta el momento no ha sido reportada en ningún paciente con diagnóstico

clínico, enzimático o molecular de EG, sin embargo, ha sido descrita por Neumann *et al.*, (2009) en una muestra de 790 pacientes británicos afectados con enfermedad de Parkinson, reportándola como una mutación puntual no descrita antes en exones (153) ; Neumann *et al.*, realizaron una comparación entre especies de los aminoácidos afectados, reportando que esta variante se encuentra altamente conservada en la mayoría de las especies de mamíferos, pero no en ratas, peces cebra, *C. elegans* y *D. melanogaster*. Estos hallazgos sugirieron que esta variante en el gen *GBA* no sólo provocan una alteración en la secuencia de aminoácidos, sino que también es muy probable que tenga un comportamiento patogénico. Sin embargo, el efecto funcional preciso y los efectos en los portadores hoy en día no han sido develados. Por su parte, Lorraine (2018), realizó estudios basados en el reporte de variantes genéticas que pueden usarse para evaluar el riesgo de enfermedad con cuerpos de Lewy, en 592 pacientes del instituto Alzheimer's Disease Research Center (ADRC) usando los genes *GBA*, *SMPD1*, *HEXA* y *MCOLN1* (152); reportaron variantes del gen *GBA* en el 6,9% (41/592) de todos los sujetos. Al clasificar a los sujetos por el efecto fenotípico conocido (en términos de la enfermedad de Gaucher) de la mutación, como en los estudios previamente publicados, se observaron 2 variantes silenciosas (11191, Q226Q), 11 leves (todos N370S), 3 severos (2 L444P y 1 R463C), y 25 de efecto fenotípico desconocido en donde incluyeron la variante c.1444G>A p. Asp482Asn encontrada en 1/ 592 pacientes (154).

La variante patogénica c.259C>T p. Arg87Trp se reportó en este trabajo con una frecuencia del 0,009; ha sido registrada en las bases de datos poblacionales, de genomas y enfermedades y hasta el momento no ha sido reportada en estado de homocigosis o heterocigosis en algún paciente afectado con EG. Esta variante fué reportada por Ortiz-Cabrera *et al.*, (2016) en un estudio donde recolectaron muestras de sangre de pacientes con EG para análisis enzimáticos y genéticos (155). El análisis genético se realizó en el ADN de 124 pacientes no relacionados y 57 familiares entre 2007 y 2015. En 46 de 93 pacientes con EG (49,5%) se encontraron los dos alelos mutantes. La variante más común fué N370S (c.126A> G; nomenclatura actual p. Asp409Ser) (en el 50,5% de los pacientes), seguida de L444P (c.1448T> C; nomenclatura actual p. Leu483Pro) (en el 24,7%). La variante c.259C>T p. Arg87Trp fué reportada en heterocigosis

compuesta junto a c.1226A > G p.N409S (N370S) en un paciente afectado. Cullufi *et al.*, (2019) informó el caso de una familia en la que todos los miembros de más de dos generaciones presentaron al menos esplenomegalia (156). La secuenciación del gen *GBA* en los tres hermanos de la primera generación reportó la presencia de las mismas tres variantes heterocigotas compuestas en cada paciente: c.259C> T (p. Arg87Trp; "R48W" según nomenclatura histórica), c.1265_1319del (p. Leu422Profs *); y c.1342G> C (p.Asp448His; "D409H"). Las consecuencias previstas para las tres variantes patogénicas varían. Mientras que la delección p. Leu422Profs * 4 se ha catalogado como un verdadero alelo de pérdida de función, la variante c.259C> T (p. Arg87Trp) y c.1226A> G (p. Asn409Ser) dan como resultado proteínas mutadas sin sentido que pueden retener la funcionalidad residual. Además, c.1226A> G (p. Asn409Ser) ha demostrado representar una mutación particularmente leve.

Por su parte, los estudios de Sheth *et al.*, 2019 determinaron el espectro de variantes y la patología molecular de la EG en la India, investigando 100 pacientes no relacionados (rango de edad: 1 día a 31 años) que tenían esplenomegalia, con o sin hepatomegalia, citopenia y anomalías óseas (61). El análisis bioquímico reportó una reducción significativa de la actividad de la β -glucosidasa en todos los pacientes. La secuenciación de Sanger estableció 71 pacientes con mutación homocigótica y 22 pacientes con variante heterocigótica compuesta en el gen *GBA1*. En general, el estudio identificó 33 variantes en 100 pacientes que también incluyeron cuatro variantes sin sentido (p. Ser136Leu, p. Leu279Val, p. Gly383Asp, p. Gly399Arg) no reportadas previamente en pacientes con EG. La mutación p. Leu483Pro se identificó como la mutación de la EG más común en el estudio (62% de los pacientes) y adicionalmente, reportaron la variante c.259C>T p. Arg87Trp en heterocigosis compuesta en un paciente diagnosticado con EG2. Finalmente, Cullufi *et al.*, (2021) caracterizaron una cohorte de 36 pacientes albaneses con EG, 31 con EG tipo 1 y 5 afectados por EG tipo 2, 3, y un fenotipo EG intermedio entre el tipo 2 y el tipo 3 (157). Detectando 12 alelos diferentes de GB, siendo p. Asn409Ser el más frecuente observado fué , seguido de p. Asp448His; His294Gln. Dentro de los 12 alelos encontrados, c.259C> T p. Arg87Trp se reportó en un paciente afectado en estado de heterocigosis compuesta.

Con respecto a la variante c.247C>T p. Arg83Cys (R44C) reportada con una frecuencia del 0,0062 en este estudio, ha sido registrada en las bases de datos poblacionales, de genomas y enfermedades. No ha sido reportada hasta el momento en pacientes afectados con la EG. Fué observada por Ruskey *et al.*, (2019) en un estudio realizado en 735 pacientes AJ con EP y 662 controles AJ, de Israel y Nueva York donde se identificaron 17 pacientes con EP con variantes en *GBA*. Se encontraron variantes de *GBA* en el 18% de los pacientes con EP y 7.5% de controles (158). Curiosamente, encontraron una frecuencia sorprendentemente alta de la variante c.247C>T p. Arg83Cys en la población control (1.06%). Esta variante presentó un particular interés, ya que en los pacientes controles la frecuencia de esta variante fué aproximadamente 4 veces mayor que en los pacientes con EP. Por lo tanto, será importante examinar el efecto de la variante en poblaciones adicionales de AJ y otras ascendencias, proponiendo que, de esta manera, algunos de los controles (reclutados en edad temprana sin ningún dato clínico), puede desarrollar EP en el futuro; de esta manera, aunque existe buena evidencia que vincula las variantes de *GBA* con una variedad de fenotipos neuropsiquiátricos en la EP y otras enfermedades y basados en la hipótesis de pérdida y ganancia de función para explicar el vínculo mecanicista entre las variantes de *GBA* y la expresión de sinucleinopatías, los mecanismos subyacentes a estas asociaciones aún no están claros.

Las variantes c.669G>T p. Trp223Cys y c.134C>T p. Pro45Leu reportadas con una frecuencia del 0,0062 y 0,0218 respectivamente en este estudio, han sido registradas en las bases de datos poblacionales, de genomas y enfermedades. De acuerdo con la base de datos Clinvar presentan una significancia clínica incierta, sin embargo, al determinar su funcionalidad en bases de datos bioinformáticas, por medio de tecnología *in-silico* se determinó su posible acción patogénica en la proteína. Hasta el momento no se han reportado en ningún caso de paciente afectado con EG o EP por lo que sería necesario realizar estudios de funcionalidad asociados a determinar la acción proteica de acuerdo con la cigosis correspondiente.

Por otro lado, al observar las variantes que presentaron una significancia clínica benigna, se encontró que el cambio c.454+47G>A se presentó con la frecuencia más alta en las muestras (90%). Esta variante ha sido registrada en las bases de datos poblacionales, de genomas y enfermedades y hasta el momento no ha sido reportada en estado de homocigosis o heterocigosis en algún paciente afectado con EG. Esta variante fué reportada por Dutra *et al.*, (2019) en una investigación realizada de variantes en los genes *GBA* y *CHCHD2* en pacientes con enfermedad de Parkinson en una muestra de la población brasileña; en donde identificaron ocho cambios intrónicos y el más incidente fué c.454 + 47G> A (rs3115534), encontrado en 169/304 probandos, en homocigosis en el intrón 4 del gen *GBA*, los pacientes afectados con EP presentaron esta variante en conjunto con otras variantes de significancia clínica patogénica en el mismo gen (159). De acuerdo con las investigaciones realizadas por Carvalho (2012) el análisis *in-silico* mediante programas como NNSPLICE realizado en alteraciones intrónicas como c.454 + 47G> A reportan que no se da una afección en el reconocimiento de los sitios donantes y los sitios receptores (160). Esta variante está descrita en la base de datos de SNPs, sin embargo, no se ha asociado por si sola con ningún tipo de enfermedad. Así mismo, considerando que esta variante intrónica parece no afectar el reconocimiento del sitio de splicing y según los análisis bioinformáticos realizados, se ha concluido que esta alteración no es patogénica.

Una segunda variante con significancia clínica benigna (c38A>G p. Lys13Arg) se encontró con una frecuencia elevada representada en el 54% de las muestras; Esta variante ha sido registrada en las bases de datos poblacionales, de genomas y enfermedades y hasta el momento no ha sido reportada en estado de homocigosis en pacientes afectados con EG. Esta variante fué reportada por primera vez por Rozenberg *et al.*, (2006) en un estudio realizado en 40 pacientes brasileños no relacionados con la enfermedad de Gaucher tipo 1 mediante una combinación de RFLP, dHPLC y procedimientos de secuenciación de ADN (161); este estudio determinó 12 nuevas variantes entre las que se incluyó c.38A> G p.Lys13Arg (K-27R); esta variante se encontró en heterocigosis compuesta junto a N370S/W184R/K(-)27R (A1226G/T667C/A38G). De acuerdo con Rozenberg *et al.*, (2006) esta alteración afecta al péptido señal compuesto

por 39 residuos que se elimina de la enzima madura durante el procesamiento. Las variantes en esta secuencia líder no se han encontrado comúnmente entre los pacientes con enfermedad de Gaucher. Dado que K (-27) R es la primera mutación sin sentido informada en la secuencia líder, sería interesante investigar en el futuro si altera el transporte citoplasmático; sin embargo, las otras variantes de este paciente, N370S y W184R, pueden ser las únicas causas del fenotipo en el paciente reportado en sus estudios con EG y este conjunto de variantes (58).

El resto de las variantes, presentaron frecuencias entre 0,009 y 0,05; de acuerdo con los softwares de predicción utilizados para interpretar los efectos funcionales de las variantes de secuencia, predicen que estas serían unas variantes benigna y bien tolerada, reflejando así la baja probabilidad de asociarse con un fenotipo clínico de EG; no obstante, algunas variantes clasificadas como probablemente benignas o benignas podrían funcionar como modificadores de la enfermedad: variantes que no causan la enfermedad, pero que puede empeorar el resultado, por lo que se hace importante realizar un seguimiento estricto a las posibles re-clasificaciones *in-silico* que se puedan abordar; así mismo, será importante iniciar estudios en aquellas variantes que no se han reportado previamente y de las cuales será necesario iniciar estudios predictivos para reconocer su significancia clínica.

Finalmente, a partir de la red de interacción de genes basada en *GBA*, se puede determinar la estrecha relación entre diversos genes, que mantienen una alta interacción entre si, lo que posiblemente permitiría entender la razón por la cual los lisosomas requieren la presencia de muchas proteínas especializadas para facilitar su papel en el mantenimiento celular y así mismo, explicar los diversos fenotipos y las diferentes manifestaciones clínicas que se presentan en muchos de los pacientes con EG.

Estas redes evidencian la función natural necesaria para el desarrollo de procesos biológicos propios de genes afectados por el funcionamiento normal o anormal del gen *GBA*, como lo es el catabolismo y metabolismo de los lípidos. Es así como la estrecha interacción del gen *GBA* con genes cercanos como *PSAP*, *LAMP2* y *SCARB2* genera que un daño específico en alguno de estos

genes altere también la actividad de los otros, dando lugar a efectos secundarios en el organismo.

Uno de los genes relacionados con GBA que se ha discutido ampliamente es el *PSAP*, el cual codifica para la saposina C, el principal activador de la β -glucocerebrosidasa; este gen se encuentra localizado en el locus 10q21-22; la saposina C es un activador establecido para la hidrólisis de glucosilceramida por GCasa en lisosomas (161). Las deficiencias o disfunciones de estos activadores pueden dar lugar a trastornos de almacenamiento lisosómico que se asemejan a deficiencias de la enzima activada por esta vía en particular. La deficiencia de prosaposina da como resultado la acumulación de sustratos de esfingolípidos que son hidrolizados por enzimas asociadas a Sap que incluyen sulfátidos, glucosilceramida, lactosilceramida, galactosilceramida, digalactosilceramida, ceramida y gangliósidos GM2 y GM3 .

La actividad reducida de la enzima glucocerebrosidasa en la EG se debe principalmente a un plegamiento incorrecto de la proteína y al tráfico inadecuado de la enzima al lisosoma, o la ausencia total de la proteína resultante de las variantes patogénicas. Sin embargo, algunas variantes dan como resultado una actividad enzimática residual disminuida in vitro al causar cambios estructurales o bioquímicos que interfieren con el mecanismo de activación por la Sap C (162). La variante N370S provoca una sustitución de aminoácidos que limita la capacidad de la enzima mutante para interactuar con Sap C y unirse a membranas que contienen fosfolípidos aniónicos (163). Los modelos computacionales sugieren que esta mutación también disminuye la flexibilidad de la proteína alrededor del sitio activo, particularmente en el bucle 1 (residuos 311-319). Esta rigidez puede reducir las conformaciones disponibles para la enzima, evitando que establezca adecuadamente una interfaz de unión para la interacción con Sap C (164).

Los pacientes con pSap deficiente han mostrado signos típicos como hepatoesplenomegalia y compromiso neurológico, relacionándose con el tipo 2 de la EG (165), lo que ha llevado a la búsqueda de modificadores de la enfermedad que puedan alterar el fenotipo de la EG. En humanos, la deficiencia

de saposina C debido a variantes en *PSAP* da como resultado un fenotipo similar a EG, a pesar de tener valores de la actividad glucocerebrosidasa in vitro normal.

Seis pacientes descritos con variantes en el dominio Sap C del gen *PSAP* han sido reportados con síntomas similares a EG 1 y EG 2, a pesar de tener una actividad de glucocerebrosidasa normal (166). Los ratones knockout de Sap C también exhiben fenotipos más análogos a los de EG 3 (167).

Esta relación marcada entre el gen *PSAP* y *GBA* con la EG muestra que cada vez es más evidente como la EG abarca un espectro de fenotipos y por tanto, que existe una gran heterogeneidad fenotípica y genotípica asociada con este trastorno datado para un solo gen. Es así como la falta de relaciones causales directas entre variantes específicas y fenotipos sugiere la participación de modificadores de la enfermedad que influyen en la diferenciación de signos y síntomas en pacientes con EG.

Otra de las proteínas que ha demostrado ser un actor importante en el campo de las enfermedades lisosomales es la proteína 2 de membrana integral lisosómica (*LIMP2*), codificada por el gen *SCARB2*. LIMP-2 es necesaria para la biogénesis normal y el mantenimiento de lisosomas y endosomas y también se ha identificado como receptor específico de la glucocerebrosidasa, por lo que participa en el transporte intracelular de la glucosilcerebrosidasa del retículo endoplasmático a los lisosomas (168,169). Las investigaciones sobre *LIMP2* y el gen *SCARB2* indican que las deficiencias en estos genes pueden ser un factor que contribuye a conocimientos más profundos sobre la patogénesis y heterogeneidad clínica de la EG y la base molecular de la deficiencia de la glucocerebrosidasa.

Los estudios realizados por Kurzawa-Akanbi *et al.*, (2012) reportaron que los portadores de variantes patogénicas en *GBA* demostraron un nivel significativamente reducido de proteína GCasa, actividad enzimática y retención de isoformas de glucocerebrosidasa dentro del retículo endoplásmico (RE), lo que se asoció con una mayor expresión de los marcadores lisosomales *LAMP1* y *LAMP2* (170); Reczek y col. estudiaron las variantes N370S, G202R y L444P

de *GBA* dentro del RE, y observaron que ninguna de estas variantes tuvo un efecto sobre la afinidad de *LIMP-2*, pero si se observó una sobreexpresión de este gen (171).

Aunque las mutaciones en *LIMP2* no parecen ser directamente responsables de la EG, es probable que sea uno de los muchos factores que contribuyen a la heterogeneidad fenotípica observada en pacientes con variantes en *GBA*.

Por tanto, comprender la manera en que interaccionan estos cercanos a *GBA* permitirá un mejor entendimiento de las características fenotípicas y genotípicas en pacientes afectados (172)

Finalmente, dentro de las relaciones encontradas en la red de interacción con *GBA*, se encontró una asociación entre *SCARB2* y *NEDD4* basada en localización de proteínas vacuolares; sobre este último gen se encontró que corresponde a una ubiquitina-ligasa que mejora el tráfico endosómico de varios sustratos (173). De acuerdo con Tofaris *et al* (2011) la actividad de *NEDD4* está aumentada en las neuronas dopaminérgicas que contienen cuerpos de Lewy. En modelos de *Drosophila* y rata de α -sinucleinopatía, la sobreexpresión de *NEDD4* previene la disfunción neuronal (174). De acuerdo con lo anterior, es probable que este gen pudiera estar involucrado en manifestaciones neurológicas producto de la EG, sin embargo, no existen estudios suficientes para demostrar esta interacción(175)

9. CONCLUSIÓN

En el presente trabajo se identificaron y caracterizaron las variantes genómicas del gen *GBA* encontradas en pacientes con patologías diferentes y no diagnosticados clínicamente con EG. Se encontró una alta frecuencia de variantes benignas, y encontraron 5 variantes con significancia clínica patogénica (c.1444G> A p. Asp482Asn; c.259C> T p. Arg87Trp; c.247C> T p. Arg83Cys; c.669G> T p. Trp223Cys; c.134 C> T p. Pro45Leu) circulando en la población evaluada, estando p.Arg87Trp asociada con EG en heterocigosis compuesta y p. Asp482Asn, Arg83Cys reportadas en asociación con la EP. Estos datos sugieren que las variantes en el gen *GBA*, incluso en individuos heterocigotos, podrían ser consideradas también un factor de riesgo heredado para el desarrollo de parkinsonismo.

Reportar variantes asociadas a EG en pacientes sin diagnóstico de la enfermedad genera la necesidad de realizar asociaciones fenotipo-genotipo que permitan realizar diagnósticos precoces y oportunos que conlleven a un correcto tratamiento, mejorando así la morbi-mortalidad y la calidad de vida, basados en el enfoque de la medicina de precisión.

Asimismo, deben establecerse plazos de revisión para valorar la posible reclasificación de las variantes de significancia incierta, no reportadas o benignas, pues estos resultados pueden cambiar de acuerdo con las mejoras en las técnicas de clasificación, disponibilidad de información científica adicional, y observación de una variante en más pacientes, permitiendo la emisión de nuevos informes médicos.

Aunque los genes *SCARB2*, *PSAP*, *LIMP2*, *NEDD4* no son directamente responsables de la EG, es probable que sean uno de los muchos factores que contribuyen a la heterogeneidad fenotípica observada en pacientes con variantes en *GBA*. Por lo tanto, los modificadores adicionales deben influir en el fenotipo de la EG y por tanto deben ser candidatos prometedores para ser evaluados.

Con los datos obtenidos fué posible iniciar a sugerir lineamientos de políticas mediante la publicación de los resultados, los cuales enfatizan en la importancia de programas de tamización, diagnostico precoz de pacientes y portadores que aminore el impacto de esta enfermedad en la población

PERSPECTIVAS

Dado que la gran mayoría de pacientes con EG y portadores heterocigotos de variantes en el gen *GBA* no desarrollan parkinsonismo, las variantes en el gen *GBA* podrían constituir un factor de riesgo en individuos que tienen otros factores de predisposición a la EP, realizar más estudios entorno a estas dos enfermedades permitirá enfocar los estudios y tratamientos, llevando a una medicina de precisión.

Aumentar la información reportada hasta el momento sobre esta patología, abrirá el paso a futuras investigaciones, reconociendo el impacto que puede generar en la sociedad, contribuyendo al conocimiento y creación de bases moleculares sobre la EG en el Suroccidente Colombiano y permitiendo pronosticar la evolución de la enfermedad de acuerdo con el genotipo del individuo afectado.

CONFLICTO DE INTERESES Y FINANCIACIÓN.

Los autores declaran no tener conflictos de intereses. Proyecto financiado por la convocatoria DGI-03-2020 : Proyectos de investigación aplicada, Universidad Santiago de Cali.

AGRADECIMIENTOS

Agradecimientos a los pacientes participantes, el grupo de investigación Enfermedades Congénitas del metabolismo, Grupo de Interés Colombiano en Enfermedad de Gaucher (GICEG), Posgrado en Ciencias Biomedicas- Universidad del Valle, Universidad Santiago de Cali.

REFERENCIAS

1. Nguyen Y, Stirnemann J, Belmatoug N (2019) Gaucher disease : A review. *Rev Med Interne*; 18:31185-8
2. Sun A. (2018) Lysosomal storage disease overview. Review article on *Inborn Errors of Metabolism*; 6(24): 6-12
3. Mehta A.(2006) Epidemiology and natural history of Gaucher's disease. *Eur J Intern Med*;17 Suppl:S2-5.
4. Nalysnyk L., Rotella P., Simeone J., Hamed A., Weinreb N. (2017)Gaucher disease epidemiology and natural history: a comprehensive review of the literature. *Hematology*; 22;2: 65-73.
5. ORPHANET. Enfermedad de Gaucher. Orphanet. [Internet]. [Consultado 12 Marzo 2019]. Disponible en: https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC_Exp.php?lng=ES&Expert=355
6. ADRES. Análisis De Los Recobros Correspondientes A Los Principios Activos Imiglucerasa, Miglustato, Velaglucerasa Y Taliglucerasa Medicamentos Para La Enfermedad De Gaucher. 2017. [Internet]. [Consultado:13 de marzo 2019]. Disponible en : <https://www.adres.gov.co/La-Entidad/Publicaciones/Post/5993/An%C3%A1lisis-de-los-recobros-correspondientes-a-los-principios-activos-Imiglucerasa-Miglustato-Velaglucerasa-y-Taliglucerasa-medicamentos-para-la-enfermedad-de-Gaucher>
7. Von Rossum A., Holsopple M. (2016) Enzyme Replacement or Substrate Reduction? A Review of Gaucher Disease Treatment Options. *Hospital Pharmacy*; 51(7): 553-563
8. Lavaut K, Núñez A, Nordet I, González A, Svarch, E, Machín S *et al.* (2010) Aspectos clínicos, bioquímicos, moleculares y tratamiento de 2 pacientes con enfermedad de Gaucher. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter.*26(1), 54
9. Colquicocha-Murillo M, Cucho-Jurado J, Eyzaguirre-Zapata R, Manassero-Morales G, Moreno-Larrea M, Salas K *et al.* (2015) Guía para diagnóstico y tratamiento de la Enfermedad de Gaucher. *Rev Med Hered*; 26 (2)103-121
10. Sam E. Gary, Emory Ryan, Alta M. Steward, Ellen Sidransky. (2018) Recent advances in the diagnosis and management of Gaucher

- disease. *Expert Review of Endocrinology & Metabolism* 13:2, pages 107-118.
11. Grabowski GA. (1997) Gaucher disease: gene frequencies and genotype/phenotype correlations. *Genet Test*; 1:5.
 12. Koprivica V, Stone DL, Park JK, et al. (2000) Analysis and classification of 304 mutant alleles in patients with type 1 and type 3 Gaucher disease. *Am J Hum Genet*; 66:1777.
 13. Locatelli Hoops S, Kolter T, Sandhoff K. Saposin C et al (2006) sphingolipid activator proteins. In: Gaucher disease, Futerman AH, Zimran A (Eds), CRC Press, Boca Raton. p.67.
 14. Dionisi-Vici C, Rizzo C, Burlina AB, et al. (2002) Inborn errors of metabolism in the Italian pediatric population: a national retrospective survey. *J Pediatr*; 140:321.
 15. Cadavid, F. (1925). Un caso de enfermedad de Gaucher. *Rev. Med. Quirurg. Hosp. Bogotá*. 1 (4): 167-169.
 16. Echavarrla, A., Harry, N., Bedoya, V. y L6-pe3,F (1966) Enfermedad de Gaucher. *Pediatrla (Bogotá)* 8: 67.
 17. Rodríguez, G., Alvarado, H., Yunis, E., Sabogal, A. y Garda, J. (1970) Enfermedad de Gaucher. Estudio de una familia. Trabajo presentado durante el XIII Congreso de la Sociedad Colombiana de Patología reunido en Popayán, Diciembre.
 18. Rodríguez G, Cadena D. (1972) Enfermedad de Gaucher en Colombia . *Rev. Fac. Med.*, Volumen 38, Número 1, p. 73-81. ISSN electrónico 2357-3848. ISSN impreso 0120-0011.
 19. International Collaborative Gaucher Group. (En línea). Disponible en: www.gaucherregistry.com.
 20. Lozano-Bernal JE. (2006) Enfermedad de Gaucher: Casuística del Tolima. *Acta Med Colomb* [online], vol.31, n.4 [cited 2019-11-10], pp.416-421. Available from: <http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-24482006000400005&lng=en&nrm=iso>. ISSN 0120-2448.
 21. Uribe A, Ayala A, España M, Pacheco N, Jay L, Arevalo I, Benavides J (2013). Recopilación de 18 años de tamizaje de alto riesgo para desordenes lisosomales en Colombia (1995 – 2012) IX congreso

- latinoamericano de errores innatos del metabolismo y pesquisa neonatal. Resúmenes.
22. Instituto de Evaluación Técnica en Salud – IETS. Validez de la prueba de actividad enzimática de la glucocerebrosidasa para el diagnóstico de enfermedad de Gaucher. 2014. Reporte No. 82[Internet]. [Consultado 13 Marzo 2019]. Disponible en: <http://www.iets.org.co/reportes-iets/Documentacin%20Reportes/Validez%20Diagn%C3%B3stica%20Gaucher.pdf>
 23. Misnza S. Informe De Evento enfermedades Huérfanas –Raras. Instituto Nacional de Salud. Colombia, Periodo 6. 2018. 03:1-22
 24. Instituto Nacional de Salud. Boletín Epidemiológico Semanal. Comportamiento epidemiológico de las enfermedades huérfanas. Colombia, 2016 hasta semana epidemiológica 05 de 2019. Consultado : 03 de marzo 2020 . Disponible en : <https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/BoletinEpidemiologico/2019%20Bolet%C3%ADn%20epidemiol%C3%B3gico%20semana%205.pdf>
 25. Ministerio de Salud y protección social. Ley No 1392 2010. [Internet] .[Consultado : 1 de diciembre de 2019] Disponible en <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/DE/DIJ/ley-1392-de-2010.pdf>
 26. Ministerio de Salud y protección Social. Decreto No. 1954 de 2012. [Internet] [Consultado : 1 de diciembre de 2019] Disponible en : <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/DE/DIJ/Decreto-1954-de-2012.PDF>
 27. Ministerio de Salud y protección Social. Resolución 2048 de 2015. MINSALUD. 2015. [Internet]. [Consultado:12 de marzo 2019]. Disponible en [:https://www.minsalud.gov.co/Normatividad_Nuevo/Resoluci%C3%B3n%202048%20de%202015.pdf](https://www.minsalud.gov.co/Normatividad_Nuevo/Resoluci%C3%B3n%202048%20de%202015.pdf)
 28. Ministerio de Salud y protección Social. Resolución 5265 de 2018. MINSALUD. 2015. [Internet]. [Consultado:03 de julio 2019]. Disponible en <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/DE/DIJ/resolucion-5265-de-2018.pdf>
 29. Mistry PK, Sadan S, Yang R, *et al.* (2007) Consequences of diagnostic delays in type 1 Gaucher disease: the need for greater awareness among hematologists-oncologists and an opportunity for early diagnosis and intervention. *Am J Hematol.* ;82(8):697–701.
 30. Mistry PK, Cappellini MD, Lukina E, *et al.* (2011) A reappraisal of Gaucher disease-diagnosis and disease management algorithms. *Am J Hematol.* ;86(1):110–115.

31. Thomas AS, Mehta AB, Hughes DA (2013) Diagnosing Gaucher disease: an on-going need for increased awareness amongst haematologists. *Blood Cells Mol Dis.* ;50(3):212–217.
32. Moreno LJ, Satizabal JM (2015) Mutación en heterocigosis en paciente con enfermedad de Gaucher tipo II: reporte de caso. *Revista Gastrohnap*; 17(2): 87-90
33. Moreno LJ, Satizabal JM (2017). Mutación en heterocigosis en paciente con enfermedad de Gaucher tipo II, paradigma genético o enfermedad dominante. Primer puesto trabajo de investigación. *Recent Advances in Rare Diseases- RARD*. Moscú-Rusia
34. Moreno LJ, Arturo-Terranova D, Satizabal JM (2019). Epidemiología y cálculos de frecuencia alélica y poblacional de la enfermedad de Gaucher en Colombia. *Revista de la asociación colombiana de ciencias Biológicas. Memorias XIV Congreso Nacional y V Internacional de ciencias biológicas*. Pp 584-585. ISSN 2665-265X No. 02
35. Vellodi A. (2005) Lysosomal storage disorders (review). *Br J Haematol.*;128:413-31.
36. Mankin HJ, Rosenthal DI, Xavier R. Gaucher disease. New approaches to an ancient disease. *J Bone Joint Surg.* 2001; 83: 748-762.
37. Weinreb NJ. Introduction. *Advances in Gaucher Disease: therapeutic goals and evaluation and monitoring guidelines. Semin Hematol* 2004; 41: (suppl 5): 1–3
38. Mandlebaum F. (1912) A contribution to the pathology of primary splenomegaly (Gaucher type), with the report of an autopsy on a male child four and one half years of age. *J Exp Med* ;16:797-821.
39. Brady RO, Kanfer JN, Shapiro D. (1965) Metabolism of glucocerebrosides. II. Evidence of an enzymatic deficiency in Gaucher's disease. *Biochem Biophys Res Comm*; 18: 221-225.
40. Groen JF. (1948) The hereditary mechanism of Gaucher's disease. *Blood*; 3: 1238-1249.
41. Horowitz M, Tzuri G, Eyal N, Berebi A, Kolodny EH, Brady RO, *et al* (1993). Prevalence of nine mutations among Jewish and non-Jewish Gaucher disease patients. *Am J Hum Genet.*;53:921-30.

42. Zampieri S, Cattarossi S, Bembi B, Dardis A. (2017) GBA Analysis in Next-Generation Era Pitfalls, Challenges, and Possible Solutions. *The Journal of Molecular Diagnostics*, Vol. 19, No. 5,
43. Lieberman RL (2011). "A Guided Tour of the Structural Biology of Gaucher Disease: Acid- β -Glucosidase and Saposin C". *Enzyme Research*. **2011**: 973231. [doi:10.4061/2011/973231](https://doi.org/10.4061/2011/973231).
44. Rigden DJ, Jedrzejewski MJ, de Mello LV (2003). Identification and analysis of catalytic TIM barrel domains in seven further glycoside hydrolase families". *FEBS Letters*. **544** (1–3): 103–11. [doi:10.1016/S0014-5793\(03\)00481-2](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(03)00481-2).
45. Dill KA, MacCallum JL.(2012) The protein-folding problem, 50 years on. *Science*;338:1042-6. 13.
46. Ellis RJ, Minton AP.(2006) Protein aggregation in crowded environments. *Biol Chem.*;387:485-97. 14.
47. Lindquist SL, Kelly JW. (2011)Chemical and biological approaches for adapting proteostasis to ameliorate protein misfolding and aggregation diseases: progress and prognosis. *Cold Spring Harb Perspect Biol.*;3(12):a004507.
48. Smith L, Mullin S, Schapira A. (2017) Insights into the structural biology of Gaucher disease. *Experimental Neurology*. Vol 298, Part B <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2017.09.010>
49. Stirnemann J, Belmatoug N, Camou F, Serratrice C, Froissart R, Caillaud C, et al (2017) A Review of Gaucher Disease Pathophysiology, Clinical Presentation and Treatments. *Int J Mol Sci*. 2017 Feb 17;18(2). pii: E441. doi: 10.3390/ijms18020441.
50. Boot R, Verhoek M, Fost M, et al. (2004)Marked elevation of the chemokine CCL18/PARC in Gaucher disease: a novel surrogate marker for assessing therapeutic intervention *Blood*, 103, pp. 33-39
51. Mazzulli R, Xu Y, Sun Y, Knight A, McLean P, Caldwell G, et al. (2011) Gaucher disease glucocerebrosidase and α -synuclein form a bidirectional pathogenic loop in synucleinopathies . *Cell*, 146, pp. 37-52
52. González E, Aguilar MJ, Álvarez J, & García PA. (2010). Enfermedad de Gaucher y su manejo clínico en el paciente pediátrico. *Revista Clínica de Medicina de Familia*, 3(2), 114-120. Recuperado en 24 de noviembre de

- 2019, de http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1699-695X2010000200011&lng=es&tlng=es.
53. Van Rossum A, Holsopple M. (2016) Enzyme Replacement or Substrate Reduction? A Review of Gaucher Disease Treatment Options. *Hosp Pharm*;51(7):553–563. doi:10.1310/hpj5107-553
 54. Nagral A. (2014) Gaucher Disease. *Journal of Clinical and Experimental Hepatology*; 4(1) 37-50
 55. Mignot C, Gelot A, Bessieres B, Daffos F, Vover M, Menez F (2003) Perinatal-lethal Gaucher disease. *Vol 120A (3) ; 338-344*
 56. Pastores GM, Hughes DA. (2000) Gaucher Disease. [Updated 2018 Jun 21]. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, et al., editors. *GeneReviews®* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2019. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1269/>
 57. Beutler E, Gelbart T, Scott CR. (2005) Hematologically important mutations: Gaucher disease. *Blood Cells Mol Dis*;35(3):355- 64.
 58. Acanda de la Rocha A (2012) Aspectos bioquímicos, genéticos y comorbilidades de la enfermedad de Gaucher, diagnóstico molecular en Cuba. *Rev Cubana Genet Comunit*. 2012;6(1):8-19
 59. Hruska KS, LaMarca ME, Scott CR, Sidransky E (2008) Gaucher disease: mutation and polymorphism spectrum in the glucocerebrosidase gene (GBA). *Hum Mutat* ;29(5):567-83
 60. Sheth, J., Bhavsar, R., Mistri, M., Pancholi, D., Bavdekar, A., Dalal, A., Ranganath, P., Girisha, K. M., Shukla, A., Phadke, S., Puri, R., Panigrahi, I., Kaur, A., Muranjan, M., Goyal, M., Ramadevi, R., Shah, R., Nampoothiri, S., Danda, S., Datar, C., ... Sheth, F. (2019). Gaucher disease: single gene molecular characterization of one-hundred Indian patients reveals novel variants and the most prevalent mutation. *BMC medical genetics*, 20(1), 31. <https://doi.org/10.1186/s12881-019-0759-1>
 61. Bodamer OA, Hung C. (2010) Laboratory and genetic evaluation of Gaucher disease. *Wien Med Wochenschr*;160:600-4.
 62. Franco Ornelas S. (2010) Consenso Mexicano de Enfermedad de Gaucher. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*.;48:167-86.
 63. Asselta R, Rimoldi V, Siri C, Cilia R, Guella I, Tesei S *et al* (2014) Glucocerebrosidase mutations in primary parkinsonism . *Parkinsonism Relat. Disord.*, 20, pp. 1215-1220
 64. Tsuji S, Choudary PV, Martin BM, Stubblefield BK, el alcalde JA, Barranger JA, et al. (1987) A Mutation in the Human Glucocerebrosidase Gene in Neuronopathic Gaucher's Disease. *N Engl J Med.*; 316 (10): 570-5.

65. Drugan C, Procopciuc L, Jebeleanu G, Grigorescu-Sido P, Dussau J, Poenaru L, *et al.* (2002) Enfermedad de Gaucher en pacientes rumanos: incidencia de las mutaciones y manifestaciones fenotípicas más comunes. *Eur J Hum Genet.* ; 10 (9): 511–5.
66. Riboldi, G. M., & Di Fonzo, A. B. (2019). *GBA*, Gaucher Disease, and Parkinson's Disease: From Genetic to Clinic to New Therapeutic Approaches. *Cells*, 8(4), 364. doi:10.3390/cells8040364
67. Grabowski GA, Horowitz M. (1997) Gaucher's Disease : molecular, genetic and enzymological aspects. *Baillieres Clin Haematol.* 10(4) :635-56
68. Goker-Alpan O, Hruska K, Orvisky E, Kishanani P, Stubblefield BK, Schiffmann R, Sidransky E (2005) Divergent phenotypes in Gaucher disease implicate the role of modifiers. 42(6):e 37
69. Park, J. K., Tayebi, N., Stubblefield, B. K., LaMarca, M. E., MacKenzie, J. J., Stone, D. L., Sidransky, E (2002). The E326K mutation and Gaucher disease: mutation or polymorphism? *Clin. Genet.* 61: 32-34.
70. Duran R, Mencacci NE, Angeli AV, Shoai M, Deas E, Houlden H, (2013) The glucocerebrosidase E326K variant predisposes to Parkinson's disease, but does not cause Gaucher's disease. *Mov Disord.* Feb; 28(2):232-236.
71. Chabás A, Gort L, Díaz-Font A, Montfort M, Santamaría R, Cidrás M, Grinberg D, Vilageliu L (2005) Perinatal lethal phenotype with generalized ichthyosis in a type 2 Gaucher disease patient with the [L444P;E326K]/P182L genotype: effect of the E326K change in neonatal and classic forms of the disease. *Blood Cells Mol Dis.*; 35(2):253-8.
72. Horowitz M, Pasmanik-Chor M, Ron I, Kolodny EH (2011) The enigma of the E326K mutation in acid β -glucocerebrosidase. *Mol Genet Metab.* 2011; 104(1-2):35-8.
73. Tayebi, N., Stubblefield, B. K., Park, J. K., Orvisky, E., Walker, J. M., LaMarca, M. E., Sidransky, E. (2003) Reciprocal and nonreciprocal recombination at the glucocerebrosidase gene region: implications for complexity in Gaucher disease. *Am. J. Hum. Genet.* 72: 519-534.
74. Emre, S., Gurakan, F., Yuce, A., Rolf, A., Scott, R., Ozen, H.(2008) Molecular analysis of Turkish Gaucher disease patients: identification of novel mutations in glucocerebrosidase (GBA) gene. *Europ. J. Med. Genet.* 51: 315-321.

75. Tsuji, S., Martin, B. M., Barranger, J. A., Stubblefield, B. K., LaMarca, M. E., Ginns, E. I. (1988) Genetic heterogeneity in type I Gaucher disease: multiple genotypes in Ashkenazic and non-Ashkenazic individuals. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 85: 2349-2352, 1988. Note: Erratum: *Proc. Nat. Acad. Sci.* 85: 5708 only.
76. Wigderson, M., Firon, N., Horowitz, Z., Wilder, S., Frishberg, Y., Reiner, O., Horowitz, M. (1989) Characterization of mutations in Gaucher patients by cDNA cloning. *Am. J. Hum. Genet.* 44: 365-377.
77. Grace, M. E., Smith, F., Latham, T., Horowitz, M., Berg, A., Grabowski, G. A. (1990) Gaucher disease: a molecular basis for the type 2 and type 3 phenotypes. (Abstract) *Am. J. Hum. Genet.* 47 (suppl.): A156.
78. Stone, D. L., Tayebi, N., Orvisky, E., Stubblefield, B., Madike, V., Sidransky, E. (2000) Glucocerebrosidase gene mutations in patients with type 2 Gaucher disease. *Hum. Mutat.* 15: 181-188.
79. Dahl, N., Lagerstrom, M., Erikson, A., Pettersson, U. (1990) Gaucher disease type III (Norrbottnian type) is caused by a single mutation in exon 10 of the glucocerebrosidase gene. *Am. J. Hum. Genet.* 47: 275-278.
80. Koprivica, V., Stone, D. L., Park, J. K., Callahan, M., Frisch, A., Cohen, I. J., Tayebi, N., Sidransky, E. (2000) Analysis and classification of 304 mutant alleles in patients with type 1 and type 3 Gaucher disease. *Am. J. Hum. Genet.* 66: 1777-1786.
81. Park, J. K., Orvisky, E., Tayebi, N., Kaneski, C., LaMarca, M. E., Stubblefield, B. K., Martin, B. M., Schiffmann, R., Sidransky, E. (2003) Myoclonic epilepsy in Gaucher disease: genotype-phenotype insights from a rare patient subgroup. *Pediat. Res.* 53: 387-395
82. Lucio-García C, Noriega L. (2017) Enfermedad de Gaucher: estudio de caso. Vol 24(4) 176-178 <https://doi.org/10.1016/j.af.2017.10.005>
83. Ponce E, Garcia L. (2015) Enfermedad de Gaucher. *An Real Acad Med Cir Vall*; 52: 125-142
84. Stirnemann, J.; Vigan, M.; Hamroun, D.; Heraoui, D.; Rossi-Semerano, L.; Berger, M.G.; Rose, C.; Camou, F.; de Roux-Serratrice, C.; Grosbois, B.; et al. (2012) The French Gaucher's disease registry: Clinical characteristics, complications and treatment of 562 patients. *Orphanet J. Rare Dis*, 7, 77.

85. Blass-Jaimes P. (2010) Manifestaciones óseas en enfermedad de Gaucher entre pacientes mexicanos
Acta Ortopédica Mexicana; 24(5): Sep.-Oct: 351-358
86. Campo López, C., Calabuig Alborch, J. R., Aguilar Jiménez, J., & Alonso Estellés, R.. (2004). Manifestaciones óseas de la enfermedad de Gaucher: A propósito de dos casos. Anales de Medicina Interna, 21(4), 31-36. Recuperado en 24 de noviembre de 2019, de http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0212-71992004000400006&lng=es&tlng=es.
87. Espinas OE, Faris A (1969) Acute infantile Gaucher disease in identical twins. An account of clinical and neuropathologic observations. Neurology.;19:133-40. 61.
88. Orvisky E, Park JK, La Marca ME, Ginns EI, Martin BM, Tayebi N, *et al.* (2002) Glucosylsphingosine accumulation in tissues from patients with Gaucher disease: correlation with phenotype and genotype. Mol Genet Metab.;76:262-70.
89. Giraldo P, Capablo L, Alfonso P, Latre P, García B. (2008) Manifestaciones neurológicas en pacientes con enfermedad de Gaucher y en sus familiares. Vol 131 No5; 175-179
90. Charrow, J.; Andersson, H.C.; Kaplan, P.; Kolodny, E.H.; Mistry, P.; Pastores, G.; Rosenbloom, B.E.; Scott, C.R.; Wappner, R.S.; Weinreb, N.J.; *et al.* (2000) The Gaucher registry: Demographics and disease characteristics of 1698 patients with Gaucher disease. Arch. Intern. Med., 160, 2835–2843
91. Cassinerio E, Graziadei G, Poggiali E. (2014) Gaucher disease: a diagnostic challenge for internists. Eur J Intern Med.;25:117-24
92. Marañón Zelada MR, Parra Aneiva JC, Fernández Fernández M, Parra Marañón A, Córdova Marañón E. (2011) Enfermedad de Gaucher. Revista de Investigación e Información en Salud.;6:62-71
93. Robak, T.; Urbanska-Rys, H.; Jerzmanowski, P.; Bartkowiak, J.; Liberski, P.; Kordek, R (2002). Lymphoplasmacytic lymphoma with monoclonal gammopathy-related pseudo-Gaucher cell infiltration in bone marrow and spleen—Diagnostic and therapeutic dilemmas. Leukemia Lymphoma, 43, 2343–2350.
94. Yang, H.S.; Cho, K.S.; Park, T.S. (2013) Chronic myeloid leukemia with marked splenomegaly and pseudo-Gaucher cells. Blood Res., 48, 241.
95. Dunbar, C.E.; Kohn, D.B.; Schiffmann, R.; Barton, N.W.; Nolta, J.A.; Esplin, J.A.; Pensiero, M.; Long, Z.; Lockey, C.; Emmons, R.V.; *et al.* (1998) Retroviral transfer of the glucocerebrosidase gene into CD34+ cells

- from patients with Gaucher disease: In vivo detection of transduced cells without myeloablation. *Hum. Gene Ther*; 9, 2629–2640.
96. Barton NW, Furbish FS, Murray GJ, Garfield M, Brady RO. (1990) Therapeutic response to intravenous infusions of glucocerebrosidase in a patient with Gaucher disease. *Proc Natl Acad Sci*; 87(5):1913-6.
 97. Rabah M. Shawky *, Solaf M. Elsayed (2016) Treatment options for patients with Gaucher disease. *The Egyptian Journal of Medical Human Genetics*. 17,281-285
 98. Vellodi A, Tytki-Szymanska A, Davies EH, Kolodny E, Bembi B, Collin-Histed T, et al (2009)., Management of neuronopathic Gaucher disease: revised recommendations. *J Inherit Metab Dis*.;32:660-4
 99. Sidransky E, Pastores GM, Mori M. (2009) Dosing enzyme replacement therapy for Gaucher disease: older, but are we wiser? *Genet Med*;11(2):90–1.
 100. Weinreb NJ, Charrow J, Andersson HC, Kaplan P, Kolodony EH, Mistry P, et al. (2002) Effectiveness of enzyme replacement therapy in 1208 patients with type 1 Gaucher disease after 2 to 5 years of treatment: a report from the Gaucher Registry. *Am J Med*.Aug; 113(2):112-9
 101. Weinreb NJ, Goldblatt J, Villalobos J, Charrow J, Cole JA, Kerstenetzky M, et al. Long-term clinical outcomes in type 1 Gaucher disease following 10 years of imiglucerase treatment. *J Inherit Metab Dis*. 2013 May;36(3):543-53
 102. Martins AM, Ribeiro E, Porta G, Coelho J, Semionato J, Dudeque MA, et al. (2009) Recommendations on Diagnosis, Treatment, and Monitoring for Gaucher Disease. *J Pediatr*. Oct;155(4):10-8
 103. Lee NC, Chien YH, Wong SL, Sheen JM. (2014) *Blood Cells Molecules and Diseases* Madrid: Elsevier.
 104. Carbajal RL, Gómez GF, Mora TA, Rodríguez HR, Zarco RJ.(2012) Terapia de Reemplazo Enzimático en una paciente con enfermedad de Gaucher tipo III. *Act Pediatr Mex*;33(1):9-19. 40.

105. Maas M, van Kuijk C, Stoker J, *et al.* (2003) Quantification of bone involvement in Gaucher disease: MR imaging bone marrow burden score as an alternative to Dixon quantitative chemical shift MR imaging-- initial experience. *Radiology*; 229(2):554-61
106. Ficicioglu C. (2008) Review of miglustat for clinical management in Gaucher disease type 1. *Ther Clin Risk Manag.*; 4(2):425-31.
107. Amiri M, Naim HY.(2014) Long term differential consequences of miglustat therapy on intestinal disaccharidases. *J Inherit Metab Dis.*; 37(6): 929-37
108. RESOLUCIÓN No. 2018046141 DE 26 de Octubre de 2018. Registro Sanitario CERDELGA. [Consultado 06 abril 2020] de : http://web.sivicos.gov.co/registros/pdf/15672860_2018046141.pdf
109. Coutinho M, Santos J, Matos L, Alves S (2016) Genetic Substrate Reduction Therapy: A Promising Approach for Lysosomal Storage Disorders *Diseases*, 4, 33; doi:10.3390/diseases4040033
110. Diaz-Font, A.; Chabas, A.; Grinberg, D.; Vilageliu, L. (2006) RNAi-mediated inhibition of the glucosylceramide synthase (GCS) gene: A preliminary study towards a therapeutic strategy for gaucher disease and other glycosphingolipid storage diseases. *Blood Cells Mol. Dis*, 37, 197–203
111. Balwani M, Burrow TA, Charrow J, Goker-Alpan O, Kaplan P, Kishnani PS, *et al.* (2015) Recommendations for the use of eliglustat in the treatment of adults with Gaucher disease type 1 in the United States. *Mol Genet Metab*
112. Steet R, Chung S, Lee WS, Pine CW, Do H, Kornfeld S. (2007) Selective action of the iminosugar isofagomine, a pharmacological chaperone for mutant forms of acid-beta-glucosidase. *Biochem Pharmacol*;73:1376–83.

113. Enquist IB, Nilsson E, Mañsson JE, Ehinger M, Richter J, Karlsson S. (2009) Successful low-risk hematopoietic cell therapy in a mouse model of type 1 Gaucher disease. *Stem Cells*;27 (3):744-752.
114. Grabowski GA.(2012) Gaucher disease and other storage disorders. *Hematol Am Soc Hematol Educ Program*;2012:13–8
115. Bio newsservices. AVR-RD-02 (2019) Revisado 07 de abril 2020 de : <https://gaucherdiseasenews.com/avr-rd-02/>
116. Clinical Trials . Phase 1/2 Lentiviral Vector Gene Therapy - The GuardOne Trial of AVR-RD-02 for Subjects With Type 1 Gaucher Disease. Revisado 07 de abril 2020 de: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04145037>
117. Prevail Therapeutics. Prevail Therapeutics Announces IND Active for PR001 for Treatment of Neuronopathic Gaucher Disease . Revisado 02 de abril de 2020, De: <https://ir.prevailtherapeutics.com/news-releases/news-release-details/prevail-therapeutics-announces-ind-active-pr001-treatment>
118. CRAVAT at <http://www.cravat.us/>, <http://www.cravat.us/help.jsp>.
119. Douville C, Carter H, Kim R, et al. CRAVAT: cancer-related analysis of variants toolkit. *Bioinformatics*. 2013;29(5):647–648. doi:10.1093/bioinformatics/btt017
120. Moreno-Giraldo et al (2020) Genomic variability of the mucopolysaccharidosis complex in southwestern Colombia. *Genet Mol Res*; 19(2): gmr18502 <https://doi.org/10.4238/gmr18502>
121. Wood A, Perry J, Tanaka T, Hernandez D, Zheng H, Melzer D , et al .Imputation of Variants from the 1000 Genomes Project Modestly Improves Known Associations and Can Identify Low-frequency Variant–Phenotype Associations Undetected by HapMap Based Imputation *PLoS One.*, 8 (5) (2013), p. e64343
122. 1000 Genomes Project Consortium, Auton A, Brooks LD, Durbin RM, Garrison EP, Kang HM, Korbel JO, Marchini JL, McCarthy S, McVean GA, Abecasis GR. A global reference for human genetic Nature. 2015 Oct 1;526(7571):68-74. doi:10.1038/nature15393.variation.
123. Lek M, Karczewski KJ , Minikel EV , Samocha KE , Banks E, Fennell T, O'Donnell-Luria AH, Ware JS Hill AJ., et al Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. *Nature* volume 536, pages285–291. (2016 Aug 18) ;536(7616):285-91. doi: 10.1038/nature19057
124. Sarah E Hunt, William McLaren, Laurent Gil, Anja Thormann, Helen Schuilenburg, Dan Sheppard, Andrew Parton, Irina M Armean, Stephen J

- Trevanion, Paul Flicek, Fiona Cunningham. Ensembl variation resources. Database Volume 2018. doi:10.1093/database/bay119
125. . Amberger JS, Bocchini CA, Scott AF, Hamosh A. OMIM.org: leveraging knowledge across phenotype-gene relationships. *Nucleic Acids Res.* 2019 Jan 8;47(D1):D1038-D1043. doi:10.1093/nar/gky1151
 126. . Human Mutation Landrum MJ, Kattman BL. ClinVar at five years: Delivering on the promise. *Hum Mutat.* 2018 Nov;39(11):1623-1630. doi: 10.1002/humu.23641.
 127. Stenson, P. D., Mort, M., Ball, E. V., Evans, K., Hayden, M., Heywood, S., Hussain, M., Phillips, A. D., & Cooper, D. N. (2017). The Human Gene Mutation Database: towards a comprehensive repository of inherited mutation data for medical research, genetic diagnosis and next-generation sequencing studies. *Human genetics*, 136(6), 665–677. <https://doi.org/10.1007/s00439-017-1779-6>
 128. National Center for Biotechnology Information (NCBI)[Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; [1988] – [cited 2017 Apr 06]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
 129. Quan Li and Kai Wang. InterVar: Clinical interpretation of genetic variants by ACMG-AMP 2015 guideline(The American Journal of Human Genetics 100, 1-14, February 2, 2017,<http://dx.doi.org/10.1016/j.ajhg.2017.01.004>).
 130. Adzhubei I, Jordan DM, Sunyaev SR. Predicting functional effect of human missense mutations using PolyPhen-2. *Curr Protoc Hum Genet*, Chapter 7:Unit7.20 (2013).
 131. Schwarz JM, Cooper DN, Schuelke M, Seelow D. MutationTaster2: mutation prediction for the deep-sequencing age. *Nat Methods.* 2014 Apr;11(4):361-2.
 132. Salgado, D., Desvignes, J.-P., Rai, G., Blanchard, A., Miltgen, M., Pinard, A., Lévy, N., Collod-Bérout, G. and Bérout, C. (2016). UMD-Predictor: a High Throughput Sequencing Compliant System for Pathogenicity Prediction of any Human cDNA Substitution. *Human Mutation*. Accepted Author Manuscript. doi:10.1002/humu.22965
 133. Choi Y, Sims GE, Murphy S, Miller JR, Chan AP (2012) Predicting the Functional Effect of Amino Acid Substitutions and Indels. *PLoS ONE* 7(10): e46688.

134. Vaser R, Adusumalli S, Leng S, Sikic M, Ng P. (2015) SIFT missense predictions for genomes. *Nat. Protoc.* 4, 1073–1081
135. Desmet FO, Hamroun D, Lalande M, Collod-Bérout G, Claustres M, Bérout C. Human Splicing Finder: an online bioinformatics tool to predict splicing signals. *Nucleic Acids Res.* 2009 May;37(9):e67. doi: 10.1093/nar/gkp215. Epub 2009 Apr 1. PMID: 19339519; PMCID: PMC2685110.
136. Quan Li and Kai Wang. InterVar: Clinical interpretation of genetic variants by ACMG-AMP 2015 guideline(*The American Journal of Human Genetics* 100, 1-14, February 2, 2017,<http://dx.doi.org/10.1016/j.ajhg.2017.01.004>).
137. Richards, S., Aziz, N., Bale, S. et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med* 17, 405–423 (2015). <https://doi.org/10.1038/gim.2015.30>
138. Andrews, C. (2010) The Hardy-Weinberg Principle. *Nature Education Knowledge* 3(10):65
139. Szklarczyk D, Santos A, von Mering C, Jensen LJ, Bork P, Kuhn M. STITCH 5: augmenting protein-chemical interaction networks with tissue and affinity data. *Nucleic Acids Res.* 2016 Jan 4;44(D1):D380-4.
140. Szklarczyk D, Kuhn M, Pletscher-Frankild S, Blicher TH, von Mering C, Jensen LJ, Bork P. STITCH 4: integration of protein-chemical interactions with user data. *Nucleic Acids Res.* 2014 Jan;42(Database issue):D401-7
141. Warde-Farley D, Donaldson SL, Comes O, Zuberi K, Badrawi R, Chao P, Franz M, Grouios C, Kazi F, Lopes CT, Maitland A, Mostafavi S, Montojo J, Shao Q, Wright G, Bader GD, Morris Q. The GeneMANIA prediction server: biological network integration for gene prioritization and predicting gene function. *Nucleic Acids Res.* 2010 Jul 1;38 Suppl:W214-20
142. Mazzanti Di Ruggiero, María de los Ángeles (2011). Declaración de Helsinki, principios y valores bioéticos en juego en la investigación médica con seres humanos. *Revista Colombiana de Bioética*, 6(1),125-144.[fecha de Consulta 2 de Abril de 2021]. ISSN: 1900-6896. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=189219032009>
143. Yaacov Peña, Fernando (2015). Introducción A La Ética En Investigación: Conceptos Básicos Y Revisión De La Literatura. *Revista Med*, 23(2),78-86.[fecha de Consulta 2 de Abril de 2021]. ISSN: 0121-

5256. Disponible en:
<https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=91044134009>
144. Siurana Aparisi, Juan Carlos. (2010). Los principios de la bioética y el surgimiento de una bioética intercultural. *Veritas*, (22), 121-157. <https://dx.doi.org/10.4067/S0718-92732010000100006>
145. Informe de Belmont. <https://www.hhs.gov/ohrp/regulations-and-policy/belmont-report/index.html>. [Fecha de consulta 2 de abril de 2021]
146. Declaración Universal sobre el Genoma Humano y los Derechos Humanos Conferencia General ." *Anales de la Facultad de Medicina*, vol. 62, no. 2, 2001, pp.166 - 171. Redalyc, <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=37962211>
147. Di Rocco M, Andria G, Deodato F, Giona F, Micalizzi C, Pession A (2014). Early diagnosis of Gaucher disease in pediatric patients: proposal for a diagnostic algorithm. *Pediatr Blood Cancer* ;61(11):1905-9. <https://doi.org/10.1002/pbc.25165>
148. Simon G, Erdos M, Maródi L, Tóth J. (2008) Gaucher-kór: a korai diagnózis és terápia jelentősége [Gaucher disease: importance of early diagnosis and therapy]. *Orv Hetil.* 20;149(16):743-50. <https://doi.org/10.1556/OH.2008.28337>
149. Mehta A, Belmatoug N, Bembi B, Deegan P, Elstein D, Göker-Alpan Ö, Lukina E, Mengel E, Nakamura K, Pastores GM, et al. Exploring the patient journey to diagnosis of Gaucher disease from the perspective of 212 patients with Gaucher disease and 16 Gaucher expert physicians. *Mol Genet Metab.* 2017 Nov;122(3):122-129. doi: 10.1016/j.ymgme.2017.08.002. Epub 2017 Aug 4. PMID: 28847676.
150. Mehta A, Kuter DJ, Salek SS, Belmatoug N, Bembi B, Bright J, et al. Presenting signs and patient co-variables in Gaucher disease: outcome of the Gaucher Earlier Diagnosis Consensus (GED-C) Delphi initiative. *Intern Med J.* 2019 May;49(5):578-591. doi: 10.1111/imj.14156. Erratum in: *Intern Med J.* 2019 Aug;49(8):1059. PMID: 30414226; PMCID: PMC6852187.
151. Sanchez-Gomez A. Incremento En Mutaciones De Tipo Transicional Para Atenuar El Efecto De Sesgo En La Inactivación Del Cromosoma X Conducen A La Aparición De Mutaciones Con Efecto Patológico En El Gen De La Iduronato2 Sulfatasa(Ids)(3.1.6.13) *Rev. Invest. Univ. Quindío. (Col.)*, 26(1): 135-138; 2014
152. Pastores GM, Hughes DA. (2000) Gaucher Disease. [Updated 2018 Jun 21]. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, et al., editors. *GeneReviews®* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington,

Seattle; 1993-2019. Available from:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1269/>

153. Neumann J, Bras J, Deas E, Sean S et al (2009). Glucocerebrosidase mutations in clinical and pathologically proven Parkinson's disease. *Brain*. 132:1783-94. <http://doi.org/10.1093/brain/awp044>
154. Lorraine C (2018). Predictive Value Of Combined Genetic Enzymatic And Lipidomic Data In Disease Risk For Lewy Body Disease. United States. 20180051337. <https://www.freepatentsonline.com/y2018/0051337.html>
155. Ortiz-Cabrera NV, Gallego-Merlo J, Vélez-Monsalve C, de Nicolas R (2016). Nine-year experience in Gaucher disease diagnosis at the Spanish reference center Fundación Jiménez Díaz. *Mol Genet Metab Rep*. 9:79–85. <https://doi.org/10.1016/j.ymgmr.2016.06.008>
156. Cullufi P, Tabaku M, Beetz C, Tomori S. (2019) Comprehensive clinical, biochemical and genetic screening reveals four distinct GBA genotypes as underlying variable manifestation of Gaucher disease in a single family. *Mol Genet Metab Rep*. 21:100532 <https://doi.org/10.1016/j.ymgmr.2019.100532>
157. Cullufi P, Tabaku M, Velmishi V, Gjokopulli A, et al. (2021). Genetic characterization of the Albanian Gaucher disease patient population. *JIMD Reports* 57: 52-57. <https://doi.org/10.1002/jmd2.12167>
158. Ruskey J, Greenbaum L, Roncière L, Alam A (2019). Increased yield of full GBA sequencing in Ashkenazi Jews with Parkinson's disease. *Eur J Med Genet*. 62(1):65-69 <https://doi.org/10.1016/j.ejmg.2018.05.005>
159. Dutra D (2019). Investigação de mutações nos genes GBA e CHCHD2 em pacientes com doença de parkinson em uma amostra da população brasileira. 175 f. Tese (Doutorado em Biomedicina Translacional) - Universidade do Grande Rio, Duque de Caxias.
160. Carvalho B. (2012) Rastreamento de mutações no gene GBA como fator de risco ao desenvolvimento da doença de Parkinson na população brasileira. Universidade do Grande Rio, Duque de Caxias
161. Rozenberg R, Fox D, Sobreira E, Pereira L. (2006) Detection of 12 new mutations in Gaucher disease Brazilian patients. *Blood Cells Mol Dis*. 37(3):204-9 <https://doi.org/10.1016/j.bcmd.2006.09.004>

162. Liou B, Kazimierczuk A, Zhang M, Scott CR, Hegde RS, Grabowski GA. Analyses of variant acid beta-glucosidases: effects of Gaucher disease mutations. *J Biol Chem.* 2006;281:4242–4253
163. Salvioli R, Tatti M, Scarpa S, Moavero SM, Ciaffoni F, Felicetti F, Kaneski CR, Brady RO, Vaccaro AM. The N370S (Asn370→Ser) mutation affects the capacity of glucosylceramidase to interact with anionic phospholipid-containing membranes and saposin C. *Biochem J.* 2005;390:95–103.
164. Wei RR, Hughes H, Boucher S, Bird JJ, Guziewicz N, Van Patten SM, Qiu H, Pan CQ, Edmunds T. X-ray and biochemical analysis of N370S mutant human acid beta-glucosidase. *J Biol Chem.* 2011;286:299–308
165. Tamargo RJ, Velayati A, Goldin E, Sidransky, E. (2012). The role of saposin C in Gaucher disease. *Mol Genet Metab.* 106(3), 257–263. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2012.04.024>
166. Vaccaro AM, Motta M, Tatti M, Scarpa S, Masuelli L, Bhat M, Vanier MT, Tytki-Szymanska A, Salvioli R. Saposin C mutations in Gaucher disease patients resulting in lysosomal lipid accumulation, saposin C deficiency, but normal prosaposin processing and sorting. *Hum Mol Genet.* 2010;19:2987–2997
167. Sun Y, Ran H, Zamzow M, Kitatani K, Skelton MR, Williams MT, Vorhees CV, Witte DP, Hannun YA, Grabowski GA. Specific saposin C deficiency: CNS impairment and acid beta-glucosidase effects in the mouse. *Hum Mol Genet.* 2010;19:634–647.
168. Martinez-Arias R, Comas D, Mateu E, Bertranpetit J (2001). Glucocerebrosidase pseudogene variation and Gaucher disease: recognizing pseudogene tracts in GBA alleles. *Hum Mutat.*; 17(3):191-198 <https://doi.org/10.1002/humu.4>.
169. Schnabel D, Schroder M, Sandhoff K. (1991). Mutation in the sphingolipid activator protein 2 in a patient with a variant of Gaucher disease. *FEBS Lett.*;284 (1):57-59 [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(91\)80760-z](https://doi.org/10.1016/0014-5793(91)80760-z)
170. Kurzawa-Akanbi M, Hanson PS, Blain PG, Lett D (2012). Glucocerebrosidase mutations alter the endoplasmic reticulum and lysosomes in Lewy body disease. *J Neurochem*, 123(2), 298–309. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2012.07879.x>
171. Reczek D, Schwake M, Schröder J, Hughes H, Blanz J, Jin X, et al. LIMP-2 is a receptor for lysosomal mannose-6-phosphate-independent targeting of beta-glucocerebrosidase. *Cell.* 2007;131:770–783.
172. Arturo-Terranova D, Moreno Giraldo LJ, Idrobo, Satizabal JM (2020). Variantes del gen GBA en el Suroccidente Colombiano. *Rev.*

Asoc. Col. Cienc. Biol. 1(32): 115-123.
<https://doi.org/10.47499/revistaacsb.v1i32.214>

173. Belgareh-Touze N, Leon S, Erpapazoglou Z, Stawiecka-Mirota M, Urban-Grimal D, Haguenauer-Tsapis R. Versatile role of the yeast ubiquitin ligase Rsp5p in intracellular trafficking. *Biochem Soc Trans.* 2008;36:791–6.
174. Davies SE, Hallett PJ, Moens T, Smith G, Mangano E, Kim HT, Goldberg AL, Liu JL, Isacson O, Tofaris GK. Enhanced ubiquitin-dependent degradation by Nedd4 protects against alpha-synuclein accumulation and toxicity in animal models of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis.* 2014;64:79–87.
175. Tofaris GK, Kim HT, Hourez R, Jung JW, Kim KP, Goldberg AL. Ubiquitin ligase Nedd4 promotes alpha-synuclein degradation by the endosomal-lysosomal pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108:17004–9.

ANEXOS

	CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA TOMA DE MUESTRAS GENOMICS Carrera 39 # 4 -15 Teléfono: 5534411- Cel 3132623752	GELBPT04
---	--	--------------------------------

aqu

Yo _____ identificado con CC. (TI) _____ de _____, en el presente acto autorizo a GENOMICS la realización del procedimiento de extracción de muestra sanguínea mediante venopunción o punción capilar por el profesional y/o auxiliar a cargo, confirmo que me fue explicada de forma verbal y escrita en el presente documento la forma de intervención y los posibles eventos adverso (Dolor en el sitio de punción, Hematoma, Múltiples punciones, lipotomía o desvanecimiento acompañado de vértigo, cansancio, palidez) que se pueden presentar los cuales no comprometerán mi integridad física. Entiendo que la toma de muestra es voluntaria y que puedo retirar mi consentimiento en cualquier momento antes de que me sea tomado el examen.

Mediante este consentimiento autorizo a GENOMICS el manejo de mis muestras y procesamiento. Además en caso de ser necesario autorizo el envío mediante un servicio de mensajería a alguno de sus proveedores de análisis seleccionados para el procesamiento.

Decido de manera voluntaria que se realicen las pruebas ordenadas por mi médico, dando autorización a GENOMICS para que accedan a la información suministrada por mi médico, así mismo autorizo a GENOMICS a recibir los resultados y a enviarlos al médico y/o a mí.

GENOMICS garantizará la confidencialidad y salvaguardará los datos suministrados en este consentimiento y de los resultados obtenidos según el estudio realizado.

Nombre del paciente _____	Firma del paciente _____	Fecha _____
---------------------------	--------------------------	-------------

En caso de menor de edad:

Nombre del representante legal _____	Firma del representante legal _____	Fecha _____
--------------------------------------	-------------------------------------	-------------

Nombre de Aux Laboratorio _____	Firma de Aux laboratorio _____	Fecha _____
---------------------------------	--------------------------------	-------------

Dirección: _____ Tel: _____ Ciudad: _____



Santiago de Cali 16 de Abril 2020

Señores
Posgrado
Ciencias Biomédicas.
Universidad del Valle

Estimados Doctores,

La institución prestadora de servicios GENOMICS S.A.S es una entidad fundada para educar, promover, ayudar en el diagnóstico y tratamiento de enfermedades en las cuales se recomienda el diagnóstico y tratamiento preventivo y/o precoz que permita minimizar las graves consecuencias que concomitantemente ocasionan las alteraciones genéticas moleculares. Somos una entidad especializada en la realización de pruebas bioquímicas-genéticas que cuenta con modernos equipos, de última tecnología y con el más calificado grupo de profesionales en salud especialmente entrenados para este fin.

Es de nuestro gran interés su aprobación para ser partícipes como centro de captación de la población incluyente para el desarrollo del proyecto de investigación **"IDENTIFICACIÓN DE VARIANTES GENOMICAS DEL GEN GBA EN PACIENTES CON PATOLOGIAS DIFERENTES Y NO DIAGNOSTICADOS CLINICAMENTE CON ENFERMEDAD DE GAUCHER EN EL SUROCCIDENTE COLOMBIANO"** De la estudiante en maestría de Ciencias Biomédicas de la Universidad del Valle ,

Daniela Arturo Terranova, con tutor Doctor José María Satizábal Soto y Cotutora Doctora Lina Johanna Moreno Giraldo.

Este proyecto contará con datos e información de exomas completos que se encuentran en la base de datos de la institución con consentimiento-asentimiento informado inicial firmado por los participantes.

Como institución prestadora de servicios de salud es de vital importancia la participación en este trabajo, dado que nuestra población será beneficiada y recibirá una atención integral de acuerdo con sus necesidades. Nos ponemos a su disposición para la intervención y participación que permita complementar el desarrollo de este proyecto investigativo.

Como representante legal de Genomics S.A.S quedo atenta y a su disposición.



TRINIDAD SATIZABAL SOTO
Representante Legal
C.C 31.165.101 de Palmira
GENOMICS SAS

**UNIVERSIDAD SANTIAGO DE CALI
COMITÉ CIENTÍFICO DE ÉTICA Y BIOÉTICA – “CEB-USC”
FACULTAD DE SALUD**

Santiago de Cali, 17 de abril del 2020

Docto(a): JOSÉ MARIA SATIZABAL SOTO, LINA JOHANNA MORENO GIRALDO

Estudiantes: DANIELA ARTURO TERRANOVA

Docentes y estudiantes del Programa de Medicina

E. S. M.

Asunto: Aval para el **anteproyecto de investigación** titulado: IDENTIFICACIÓN DE VARIANTES GENÓMICAS DEL GEN GBA EN PACIENTES CON PATOLOGÍAS DIFERENTES Y NO DIAGNOSTICADAS CLINICAMENTE CON ENFERMEDAD DE GAUCHER EN EL SURORIENTE COLOMBIANO

El comité Científico de Ética y Bioética de la Universidad Santiago de Cali – “CEB-USC” - Facultad de Salud en la sesión 17 de abril del 2020, según Acta N°07, en uso de sus funciones para las cuales fue creado, resuelve:

OTORGAR EL AVAL DESDE EL PUNTO DE VISTA ÉTICO Y BIOÉTICO, al proyecto en mención, con la (s) siguiente (s) recomendación (es):

- El equipo investigador del comité de ética y Bioética de la Facultad de salud, en pleno uso de sus funciones, aceptado por el consejo académico de la Universidad Santiago de Cali, encuentra alguna(s) situación(es) inconsistente(s) que puede(n) afectar, o alterar el objeto de estudio, por lo cual es responsabilidad del director, investigador o estudiantes en hacer las correcciones.
- Se solicita tener en cuenta las observaciones y sugerencias anotadas en el formato de evaluación del cual se anexa, así como en el trabajo propiamente.
- A partir de las correcciones realizadas, podrán continuar con el trabajo de campo.

Si durante el desarrollo del proyecto de Investigación, el equipo investigador encuentra alguna(s) situación(es) anormal(es) que pueda(n) perjudicar, o alterar el objeto involucrado en el estudio, o existe algún cambio de objetivos, título, u otro aspecto relevante, se debe informar de inmediato a este comité, ya que cualquier hallazgo en este sentido, puede variar el curso de la investigación, de lo cual este comité se encuentra exento de responsabilidad.

Atentamente,



DANIEL SEPULVEDA
Presidente del Comité de Ética
CC: Archivo del CEB-USC-Facultad de Salud



LUZ ELENA URIBE DE O
Secretaria del Comité de Ética

IMPACTOS DEL TRABAJO / APROPIACIÓN SOCIAL DEL CONOCIMIENTO

- Asistencia a congresos Nacionales e internacionales



 **ASOCIACIÓN COLOMBIANA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

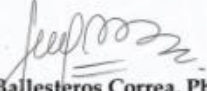
Hace constar que el trabajo titulado

ACCB-0237 EPIDEMIOLOGÍA Y CÁLCULOS DE FRECUENCIA ALÉLICA Y POBLACIONAL DE LA ENFERMEDAD DE GAUCHER EN COLOMBIA

Por los investigadores:

Lina Johanna Moreno, Daniela Arturo Terranova, José María Satizábal

Fue presentado en el marco del LIV CONGRESO NACIONAL & V INTERNACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS, realizado en el Centro de Convenciones de Montería, del 20 - 24 de mayo 2019.


Jesús Ballesteros Correa, PhD.
Presidente del Congreso





7TH LATAM ROUND TABLE
Gaucher.

Confirmamos que la Dra.

DANIELA ARTURO

ha presentado el poster "Estimation of allelic frequencies in GBA gene present in patients with and without diagnosis of Gaucher disease from southwestern Colombia" en el marco del evento

7th LATAM ROUND TABLE GAUCHER
realizado los días 17, 24 y 31 de Julio de 2020
en modalidad online.

VIRTUAL EDITION

This meeting is organized and funded by
SANOFI GENZYME

Material dirigido a profesionales de la salud - 0407-00-2020-00012 - JULIO

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL GEN GBA EN PACIENTES DEL SUROCCIDENTE COLOMBIANO CON ENFERMEDAD DE GAUCHER

Daniela Arturo-Terranova^{1,4,6}, Lina Johanna Moreno Giraldo^{1,2,3,4,5,6,7}, Henry Idrobo^{1,6,7}, José María Satizabal^{1,2,4,5,6,7}

¹Universidad del Valle

²Universidad Santiago de Cali

³Universidad Libre

⁴Posgrado en Ciencias Biomédicas – Universidad del Valle

⁵Énfasis en Genética Médica - Universidad del Valle

⁶Grupo de Investigación Enfermedades Congénitas del Metabolismo, Categoría A Colciencias 2019

⁷Grupo de Interés Colombiano en Enfermedad de Gaucher (GICEG)

*Corre electrónico: daniela.arturo@correounivalle.edu.co

Resumen

Con el objetivo de caracterizar molecularmente las variantes encontradas en el gen GBA presentes en 19 pacientes del Suroccidente Colombiano con Enfermedad de Gaucher, se realizó la secuenciación génica, encontrando 7 variantes y 8 genotipos diferentes con significancia clínica patogénica. Permitiendo identificar el espectro mutacional y la frecuencia de aparición en la población.

Palabras Clave: Biología Computacional, Enfermedad de Gaucher, gen GBA, Enfermedades por Almacenamiento Lisosomal, Variantes (DeCS)

Abstract

To molecularly characterize the variants found in the GBA gene present in 19 patients from Southwest Colombia with Gaucher's disease, gene sequencing was performed, finding 7 variants and 8 different genotypes with pathogenic clinical significance. Allowing to identify the mutational spectrum and the frequency of appearance in the population.

Keywords: Computational Biology, Gaucher Disease, GBA gene, Lysosomal Storage Diseases, Variants (DeCS)

Introducción

La Enfermedad de Gaucher (EG) se debe a la deficiencia hereditaria de la enzima glucocerebrosidasa ácida, codificada por el gen GBA, necesario para la degradación de Glucosilceramida; en consecuencia, ocurre una acumulación en el sistema retículo endotelial, predominantemente en el hígado, el bazo y la médula ósea [1]. El país no tiene datos exactos sobre la incidencia, prevalencia y carga poblacional, por lo que es difícil distinguir entre individuos sanos y portadores [2,3]. Se hace importante la

Mem. Congreso. Nac. Cienc. Biológicas ISSN 2665-265X No. 03 Noviembre 07 de 2020
Versión 55 Nacional y 6 Internacional (Virtual) -Cali 259

Dear Daniela Arturo-Terranova,

On behalf of the Scientific Programme Committee of the **ESHG 2021 Virtual Conference**, taking place from June 12-15, 2021, we are pleased to inform you that your abstract entitled *identification of genomic variants of the GBA gene in patients with different and non clinically diagnosed pathologies with gaucher disease in southwest colombia* (Control Number: 711)

has been accepted as e-Poster presentation.

For further details please click the link below: <https://www.abstractsonline.com/notify/notifyIntro.asp?Mkey=8ea52858-b7c0-4746-8ece-03eb355aa936&NKey=293B30D0-5D7B-41A9-94D8-B564737391FE>

If the link above does not open, please copy and paste it into your browser.

With kind regards,

on behalf of
Alexandre Reymond & Joris Veltman
Co-chairs of the Scientific Programme Committee

ESHG 2021 Organising Office
Vienna Medical Academy GmbH
Alser Straße 4, 1090 Vienna, Austria
t: +43 1 405 1383 30
f: +43 1 405 1383 9 30
e: conference@eshg.org
w: <https://2021.eshg.org/>

- Premio Nacional en el área de Ciencias Biomédicas

ASOCIACIÓN COLOMBIANA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

PERSONERÍA JURÍDICA 05547 – Diciembre 16 de 1974

Nit. 805.014.676-1

**"50 años promoviendo el Desarrollo, Investigación, Enseñanza y
Divulgación de las Ciencias Biológicas"**



LA SECRETARÍA EJECUTIVA

HACE CONSTAR

1. Los trabajos de investigación presentados en extenso al Congreso Nacional de la Asociación y que cumplen con los requisitos estatutarios, son sometidos a evaluación por pares académicos.
2. En consecuencia y como resultado de esta evaluación se le otorgó en el marco del LV Congreso Nacional y VI internacional de Ciencias Biológicas celebrado de manera virtual con sede organizacional en la ciudad de Cali, entre el 5 y el 7 de noviembre de 2020, el premio nacional en el área de **Ciencias Biomédicas** al trabajo:

**Caracterización molecular del gen GBA en pacientes del Suroccidente
Colombiano con enfermedad de Gaucher**

3. Que aparecen como **autores** de este trabajo las siguientes personas:

**Daniela Arturo-Terranova¹, Lina Johanna Moreno Giraldo,^{1,2,3} Henry Idrobo¹
José María Satizabal^{1,2}**

¹Facultad de Salud, Posgrado en Ciencias Biomédicas-Universidad del Valle-Cali Colombia.

²Facultad de Salud, Programa Medicina, Universidad Santiago de Cali, Cali- Colombia.

³Facultad de Salud, Programa Pediatría, Universidad Libre Seccional Cali, Cali – Colombia.

- **Publicación en revistas Indexadas**

Arturo-Terranova, D., Moreno Giraldo, L. J., Idrobo, H., & Satizabal, J. M. (2020). Variantes del gen GBA en el Suroccidente Colombiano. REVISTA DE LA ASOCIACION COLOMBIANA DE CIENCIAS BIOLOGICAS, 1(32), 115-123. <https://doi.org/10.47499/revistaacsb.v1i32.214>

VARIANTES DEL GEN GBA EN EL SUROCCIDENTE COLOMBIANO

Vol. 1 Núm. 32 (2020)

Variantes del gen GBA en el Suroccidente Colombiano

ARTÍCULOS

<https://doi.org/10.47499/revistaacsb.v1i32.214>

Publicado 2020-11-20

Daniela Arturo-Terranova*, Lina Johanna Moreno Giraldo*, Henry Idrobo*, José María Satizabal*

Resumen

Introducción: La Enfermedad de Gaucher (EG) es un trastorno genético autosómico recesivo, causado por la deficiencia de la enzima B-Glucocerebrosidasa ácida (GBA). En Colombia se ha estimado una prevalencia de 1:266.441 habitantes. Sin embargo, el país no cuenta con datos exactos sobre la incidencia, prevalencia y carga poblacional de esta enfermedad. **Objetivo:** Con el objetivo de caracterizar molecularmente las variantes encontradas en el gen GBA presentes en pacientes del Suroccidente Colombiano con enfermedad de Gaucher. **Materiales y métodos:** Se incluyeron 19 pacientes en el estudio, 57,8% de género masculino, con intervalo de edad entre 4 y 71 años, diagnosticados clínicamente y enzimáticamente con EG. Se realizó un análisis molecular del gen GBA y posteriormente se buscaron las variantes en diferentes bases de datos poblacionales y clínicas; además se realizó análisis bioinformático para evaluar el posible impacto de las variantes de interés en la estructura y funcionalidad de la proteína. **Resultados:** Se encontraron 14/19



Archivos suplementarios

PDF, Pag. 115-123

Palabras clave

Guilherme Baldo
para mí ▾

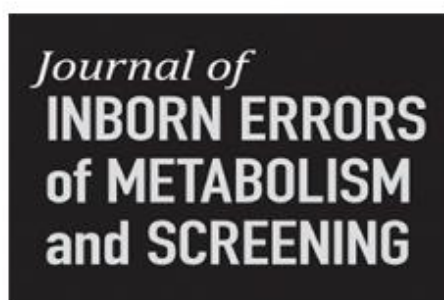
jue, 29 abr 9:51 (hace 1 día)

inglés ▾ > español ▾ [Traducir mensaje](#)[Desactivar para: inglés](#) x

29-Apr-2021

Dear Mrs. Arturo-Terranova:

It is a pleasure to accept your manuscript entitled "Molecular characterization of the GBA gene in patients from southwestern Colombia with Gaucher disease" in its current form for publication in the Journal of Inborn Errors of Metabolism and Screening.



Molecular characterization of the GBA gene in patients from southwestern Colombia with Gaucher disease

Journal:	<i>Journal of Inborn Errors of Metabolism and Screening</i>
Manuscript ID	Jiems-2020-0018.R2
Manuscript Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Arturo-Terranova, Daniela; Universidad del Valle, postgraduate in biomedical sciences; Universidad del Valle, Congenital Metabolism Diseases Research Group, Category A Colciencias 2019 Moreno Giraldo, Lina Johanna; Universidad del Valle, postgraduate in biomedical sciences; Universidad Santiago de Cali; Universidad Libre - Campus Cali; Universidad del Valle, . Universidad del Valle, Congenital Metabolism Diseases Research Group, Category A Colciencias 2019 Cali, CO Idrobo, Henry; Universidad del Valle Satizabal Soto, José María; Universidad del Valle; Universidad Santiago de Cali
Keyword:	Computational Biology, Gaucher Disease, GBA gene, Lysosomal Storage Diseases, Variants (DeCS)

SCHOLARONE™
Manuscripts



Online Journal | ISSN: 1676-5680

Genetics and Molecular Research

The Original by FUNPEC-RP



GMR18818 | Publication Fee  



adm.gmr@funpecrp.com.br <adm.gmr@funpecrp.com.br>
para mí, adm.gmr

jue, 4 mar 20:35   

 inglés >  español [Traducir mensaje](#)

[Desactivar para: inglés](#) 

Dear Daniela Arturo-Terranova,

Your paper, "IDENTIFICATION OF GENOMIC VARIANTS OF THE GBA GENE IN PATIENTS WITH DIFFERENT AND NON-CLINICALLY DIAGNOSED PATHOLOGIES WITH GAUCHER'S DISEASE IN SOUTHWEST COLOMBIA", submitted for publication in the journal Genetics and Molecular Research has been provisionally accepted based on peer review and editorial board recommendations. In order for us to provide a definitive acceptance document, the paper should be corrected according to the instructions given in the manuscript review document that we are sending along with this communication. The corrected version of your paper should be sent along with proof of payment of the publication fee within 30 days of receipt of this message. Subsequently, after final language and technical revision by our staff, you will receive a galley proof in publication format that you will need to check and approve before the paper is published.

The payment instructions are available at: <https://www.geneticsmr.com/processing-fees>.

Sincerely,

GMR | Genetics and Molecular Research
The Original by FUNPEC-RP

+55 (16) 3620-1251

[geneticsmr.com](https://www.geneticsmr.com)