

**GENÓMICA COMPARATIVA DE LAS VARIANTES EXÓMICAS DE PACIENTES
CON MPS IV-A Y SU FRECUENCIA POBLACIONAL EN UNA MUESTRA DEL
SUROCCIDENTE COLOMBIANO.**

**LINA JOHANNA MORENO GIRALDO
M.D. PEDIATRA**

**UNIVERSIDAD DEL VALLE
FACULTAD DE SALUD
ESCUELA DE CIENCIAS BÁSICAS
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS - 7670
SANTIAGO DE CALI
2018**

**GENÓMICA COMPARATIVA DE LAS VARIANTES EXÓMICAS DE PACIENTES
CON MPS IV-A Y SU FRECUENCIA POBLACIONAL EN UNA MUESTRA DEL
SUROCCIDENTE COLOMBIANO.**

**LINA JOHANNA MORENO GIRALDO
M.D. PEDIATRA**

**Trabajo de grado como requisito para optar al título de:
MAESTRIA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
CON ÉNFASIS EN GENÉTICA MÉDICA**

**Director
ADALBERTO SÁNCHEZ GÓMEZ PhD.**

**UNIVERSIDAD DEL VALLE
FACULTAD DE SALUD
ESCUELA DE CIENCIAS BÁSICAS
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS 7670
SANTIAGO DE CALI
2018**

NOTA DE ACEPTACIÓN

Presidente del Jurado

Jurado

Jurado

Santiago de Cali, _____

AGRADECIMIENTOS

Agradezco principalmente a mi Esposo José María Satizábal Soto por todo su amor, comprensión y apoyo incondicional; a mi madre Lily Giraldo Anaya y a mis tíos Oscar Giraldo y María Sol Giraldo por estar siempre a mi lado, acompañándome en cada eslabón de mi vida; a mi director de tesis Dr. Adalberto Sánchez por todas sus enseñanzas, tiempo y acompañamiento. A la Universidad del Valle por darme esta oportunidad de estudio y de mejora académica – profesional; a la Instituto de Genética Médica GENOMICS y la Fundación para la Prevención de la Discapacidad FUNDIS de la ciudad de Cali por todo el apoyo y la información suministrada y en especial a todos los pacientes y sus familias por quienes realizamos este trabajo en búsqueda de nuevos horizontes de bienestar integral y personalizada.

CONTENIDO

Pág.

RESUMEN.....	9
ABSTRACT	11
INTRODUCCIÓN.....	12
1. JUSTIFICACIÓN.....	14
2. OBJETIVOS	17
2.1 OBJETIVO GENERAL.....	17
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
3. MARCO TEÓRICO	18
3.1 EL GEN Y LA ENZIMA GALNS	19
3.2 EL SITIO ACTIVO Y LA UNIÓN DEL LIGANDO	24
3.3 MANIFESTACIONES CLÍNICAS	25
3.4 DIAGNÓSTICO ENZIMÁTICO DE LAS MPS IV-A.....	27
3.5 GENÉTICA MOLECULAR DE LA MUCOPOLISACARIDOSIS TIPO IV-A...28	
4. METODOLOGÍA.....	33
4.1 TIPO DE ESTUDIO	33
4.2. GENÓMICA COMPARATIVA DE LAS VARIANTES EXÓMICAS DE PACIENTES CON MPS IV-A.	33
4.2.1 Población de Estudio	33
4.2.2 Criterios de Inclusión	33
4.2.3. Criterios de Exclusión	34
4.2.4. Diagnóstico Enzimático de la MPS IV-A	34
4.2.5. Diagnóstico Molecular de la MPS IV-A.	34
4.2.6. Análisis Bioinformático.....	34
4.2.5 Métodos in Silico	36

4.2.5.1 Métodos Bayesianos	37
4.2.5.1.1 Polymorphism Phenotyping v2.....	37
4.2.5.1.2 Mutation Taster.....	38
4.2.5.2 Métodos de análisis de conservación	39
4.2.6 Cálculo de frecuencias génicas y alélicas	42
4.2.7 Red interacción proteínas - moléculas pequeñas	42
5. RESULTADOS	44
5.1 DESCRIPCIÓN DE LAS VARIANTES DEL GEN GALNS EN PACIENTES CON DIAGNÓSTICOS DE PATOLOGÍAS DIFERENTES A MORQUIO A Y CÁLCULO DE SUS FRECUENCIAS GÉNICAS Y ALÉLICAS.....	50
5.2 INTERACCIÓN DE VARIANTE PATOGENICA CON PROTEÍNAS ASOCIADAS	58
5.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE FISHER.....	61
6. DISCUSIÓN.....	62
7. CONCLUSIÓN.....	68
8. PERSPECTIVAS	70
BIBLIOGRAFÍA.....	71
ANEXOS	78

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Localización Citogenética y Características del Gen GALNS.....	20
Figura 2. Estructura Terciara de GALNS. La predicción de la estructura terciara se realizó empleando el servidor I-tasser	22
Figura 3. El GALNS humano y su estructura general.....	23
Figura 4. El sitio activo y la unión del ligando del GALNS.	24
Figura 5. Reacción enzimática para la cuantificación de la enzima GALNS.....	27
Figura 6. Algoritmo usado para la interpretación de las variantes detectadas en este estudio.	41
Figura 7. Red de Interacción del gen GALNS con otras moléculas – proteínas. ...	59

ABREVIATURAS

Abreviatura	Término
MPS IV-A:	Mucopolisacaridosis tipo IV – A.
MORQUIO – A:	Mucopolisacaridosis tipo IV – A.
OMIM:	Online Mendelian Inheritance in Man.
GalNAc-6-sulfatasa,	GalNAc-6-sulfatasa, GALNS -E.C.3.1.6.4: N-Acetilgalactosamina-6-sulfatasa:
GAGs:	Glucosaminoglicanos.
C6S:	Condroitin - 6- Sulfato.
KS:	Queratán Sulfato.
N.V.	Nacidos Vivos.
MEC	Matriz Extracelular.
TRE:	Terapia de Reemplazo Enzimático.
FDA:	Food and Drug Administración de EE.UU.
EURORDIS:	Organización Europea de Enfermedades Raras.
kb:	Kilobases.
pb:	Par de bases.
PCR:	Reacción en Cadena de la Polimerasa.
CNV:	Variación en el Número de Copias.
QF-PCR	Reacción en Cadena de Polimerasa Fluorescente Cuantitativa.
NA	No Aparece
NGS:	Next Generation Sequencing.
RE:	Retículo Endoplásmico.
FGE:	Enzima Generadora de Formilglicina.
SUMF1	Sulfatase Modifying Factor 1.

RESUMEN

La Mucopolisacaridosis tipo IV-A (MPS IV) o Síndrome de Morquio-A, es una enfermedad hereditaria autosómica recesiva causada por un defecto genético que genera deficiencia de la enzima N-acetil-galactosamina-6-sulfato-sulfatasa (GalNAc-6-sulfatasa, GALNS E.C.3.1.6.4), lo que lleva a una acumulación de C6S y KS en tejidos y órganos; esta acumulación conduce a anormalidades musculoesqueléticas severas, baja estatura, problemas cardíacos, respiratorios, pérdida auditiva, de visión y afectación de múltiples órganos y sistemas conllevando a una alta morbilidad y mortalidad.

La incidencia promedio estimada de esta enfermedad en la población mundial está alrededor de 1 caso por cada 50 a 100 mil habitantes; La Mucopolisacaridosis tipo IV es la más frecuente en Colombia 0,68 casos por 100.000 nacidos vivos, sin embargo actualmente no se conoce exactamente la prevalencia – carga poblacional de esta patología en nuestro país.

El estudio de enfermedades mediante técnicas como la genómica comparativa, ha permitido un análisis completo del genoma o de la parte codificante del mismo, el exoma, mediante una variedad de herramientas bioinformáticas lo cual ha llevado a entender mejor la estructura, función y procesos evolutivos que actúan sobre los genes humanos, su incidencia y prevalencia, la predicción de genes así como el descubrimiento de nuevos elementos del genoma, con el objetivo de crear nuevas estrategias de tratamiento, y avanzar en nuestro conocimiento de los mecanismos generales de la evolución y predicción de estas patologías. De esta manera, el objetivo del presente trabajo se basó en la realización de genómica comparativa de las variantes exómicas de pacientes con MPS IV-A y su frecuencia poblacional en pacientes del Suroccidente Colombiano.

Palabras Claves: Mucopolisacaridosis tipo IV-A (MPS IV-A) o Síndrome de Morquio-A, GALNS, C6S, KS, Genómica Comparativa, Variantes Exómicas, Prevalencia Poblacional.

ABSTRACT

Mucopolysaccharidosis type IV-A (MPS IV-A) or Morquio-A Syndrome, is an inherited autosomal recessive disease caused by a genetic defect that generates deficiency of the enzyme N-acetyl-galactosamine-6-sulfate-sulfatase (GalNAc-6 sulfatase, GALNS EC3.1.6.4), which leads to an accumulation of C6S and KS in tissues and organs; This accumulation leads to severe musculoskeletal abnormalities, short stature, heart problems, respiratory problems, hearing loss, vision and involvement of multiple organs and systems leading to high morbidity and mortality. The estimated average incidence of this disease in the world population is around 1 case per 50 to 100 thousand habitants. Mucopolysaccharidosis type IV is the most frequent in Colombia 0.68 cases per 100,000 live births, however at present the prevalence - population burden of this pathology in our country is not currently known. In the study of diseases through techniques such as comparative genomics, it has allowed a complete analysis of the genome or the coding part thereof, the exome, by means of a variety of bioinformatic tools which has led to a better understanding of the structure, function and evolutionary processes that act on those of human genes, their incidence and prevalence, the prediction of genes as well as the discovery of new and non-coding but functional elements of the genome, with the aim of creating new treatment strategies, and advancing our knowledge of the general mechanisms of the evolution and prediction of these pathologies. In this way, the objective of this work is based on performing the comparative genomics of the exomic variants of patients with MPS IV-A and its estimation of its population frequency in patients from the Colombian Southwest.

Key Words: Mucopolysaccharidosis type IV-A (MPS IV-A) or Morquio-A syndrome, GALNS, C6S, KS, Comparative Genomics, Exomic Variants, Population Prevalence.

INTRODUCCIÓN

La N-acetilgalactosamina-6-sulfato sulfatasa (GALNS) es la enzima lisosomal encargada del catabolismo de los glicosaminoglicanos (GAGs) queratán sulfato (QS) y condroitín-6-sulfato (C6S), mediante la remoción del sulfato presente en los residuos de galactosa y N-acetilgalactosamina, respectivamente. La deficiencia en la actividad de GALNS produce la Mucopolisacaridosis IV A (MPS IVA, OMIM 253000) o enfermedad de Morquio A, en la que el QS y C6S se acumulan en el interior del lisosoma, produciendo alteraciones en la estructura celular de diferentes tejidos, principalmente en hueso, cartílago y córnea. La enfermedad fue inicialmente descrita por el pediatra uruguayo Luís Morquio en 1929, en 4 hermanos que presentaron distrofia esquelética familiar severa. Las principales características de los pacientes con MPS IVA incluyen: displasia esquelética severa, hipoplasia de la odontoides, pectus carinatum, genu valgum, laxitud de articulaciones, opacidad corneal, enfermedad de válvulas cardíacas y alteraciones respiratorias y auditivas; sin las alteraciones del sistema nervioso central observadas en otras MPS.¹

En Colombia, los estudios realizados por Gómez et al, año 2012, propusieron para nuestro país una incidencia de MPS IVA de 0,68:100.000 (NV).²

Colombia no cuenta con cifras exactas sobre la incidencia de esta enfermedad, sin embargo, algunos estudios sugieren que Colombia podría ser uno de los países con mayor número de individuos afectados con MPS IV A. En la población colombiana se han llevado a cabo estudios en MPS IVA, como el realizado en 1996 por Kato et al. Donde se identificaron tres mutaciones de tipo missense

1. 1 Díaz JC, Suárez MA, Tomatsu SA. Contribución Colombiana Al Conocimiento Colombian Contribution To Knowledge. Issn. 2012;34(3):221–41.
2. 2 Gómez, AM., García-Robles, R., Suárez-Obando, F. Estimación de las frecuencias de las mucopolisacaridosis y análisis de agrupamiento espacial en los departamentos de Cundinamarca y Boyacá. Biomédica, 32(4), 602–9. 2012 <http://doi.org/10.7705/biomedica.v32i4.574>

G301C, S162F y F69V, en una muestra poblacional de 12 pacientes analizados.³ Siendo la MPS IVA la más frecuente en el país.

Adicionalmente, se ha documentado el hallazgo de esculturas precolombinas con claros rasgos de individuos afectados con MPS IVA; lo que sugiere la presencia del desorden en nuestra población desde la época prehispánica y la existencia de un efecto fundador.

De esta forma, el presente estudio busca ampliar el conocimiento sobre esta patología usando herramientas bioinformáticas que permitan realizar procesos de genómica comparativa de las variantes exómicas de pacientes con diagnóstico clínico, enzimático y molecular de MPS IV-A y calcular su prevalencia a partir de una muestra poblacional de afectados procedentes del suroccidente colombiano.

3. 3 Kato, Z., Fukuda, S., Tomatsu, S., Vega, H., Yasunaga, T., Yamagishi, A., ... Kondo, N. A novel common missense mutation G301C in the N-acetylgalactosamine-6- sulfate sulfatase gene in mucopolysaccharidosis IVA. Human Genetics, 101(1), 97–101. 1997 <http://doi.org/10.1007/s004390050594>

1. JUSTIFICACIÓN

La incidencia de Morquio-A varía dependiendo de la región geográfica. Leadly et al⁴, presentaron un sumario de las distintas estimaciones realizadas de la incidencia de la enfermedad; de esta manera, se estimó un caso de MPS IV-A por cada 201.000 nacimientos en Australia, uno por cada 263.000 nacimientos en Alemania y un caso por cada 500.000 nacimientos en Japón; presentándose la enfermedad con mayor frecuencia en familias y comunidades endogámicas. Adicionalmente, presentaron una estimación de la prevalencia puntual (número de personas que tienen la enfermedad en un momento determinado) del síndrome de Morquio A, que oscila entre un caso por cada 600.000 habitantes en Reino Unido hasta un caso por 1.872.000 habitantes en Malasia.⁵

En Colombia, las enfermedades complejas y raras se han caracterizado por la carencia de claridad dentro del sistema de seguridad social vigente, debido a su baja prevalencia, difícil diagnóstico, escaso tratamiento y alto precio de los medicamentos (por lo cual se consideran de alto costo).⁶ Estudios realizados por el Ministerio de Salud y Protección Social Colombiano⁷ mostraron que en 2017 el total de usuarios caracterizados con MPS IV-A ascendía a 82 y en términos de análisis de frecuencia, Antioquia era el departamento con la mayor concentración de pacientes (23 casos), seguido de Bogotá (15 casos) y Valle del Cauca (8 casos). Sin embargo, a pesar de conocer los datos anteriores, definir un índice de prevalencia de la enfermedad en el país sigue generando complicaciones y

4. 4 Leadley, R. M., Lang, S., Misso, K., Bekkering, T., Ross, J., Akiyama, T. Kleijnen, J. A systematic review of the prevalence of Morquio A syndrome: challenges for study reporting in rare diseases. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 9, 173. 2014 <http://doi.org/10.1186/s13023-014-0173-x>
5. 5 Hendriksz CJ, Harmatz P, Beck M, Jones S, Wood T, Lachman R, et al. Review of clinical presentation and diagnosis of mucopolysaccharidosis IVA. *Mol Genet Metab*. 2013;110(1–2):54–64.
6. 6 Harmatz PR, Mengel KE, Giugliani R, Valayannopoulos V, Lin SP, Parini R, et al. Longitudinal analysis of endurance and respiratory function from a natural history study of Morquio A syndrome. *Mol Genet Metab* [Internet]. Elsevier B.V.; 2015;114(2):186–94. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymgme.2014.10.015>
7. 7 Cuevas RJ. Inferencia Bayesiana e Investigación en salud: un caso de aplicación en diagnóstico clínico. 2015;21(3):9–16.

vacíos de información; si bien, los estudios realizados por Gómez et al,⁸ propusieron para Colombia una incidencia de MPS IV de 0,68:100.000 (NV), estos no especificaron el subtipo de MPS IV al cual hacen referencia en sus estudios y sus investigaciones se han restringido únicamente al altiplano cundiboyacense, por lo que no tiene representatividad nacional y, en consecuencia, podría sub o sobreestimar la incidencia de la enfermedad en el país; teniendo en cuenta que se conoce que en el Suroccidente Colombiano existen comunidades indígenas que reportan alta frecuencia por su endogamia. A pesar de no tener un número exacto y preciso de prevalencia de MPS IV-A, se podría pensar que su prevalencia puntual en Colombia es relativamente alta, en relación con otros países teniendo en cuenta los datos existentes; sin embargo debe realizarse más investigación en torno a la incidencia y prevalencia de la enfermedad por área geográfica, así como el conocimiento de las características de las variantes genéticas que se puedan presentar en los pacientes que sufren este síndrome, pues todo esto en conjunto conduce a una atención más dirigida y personalizada.

Hoy en día, el entendimiento de las bases moleculares de las enfermedades ha avanzado de manera rápida de la mano de los avances tecnológicos. En genética humana, el desarrollo de nuevas metodologías, junto con los proyectos planteados para el estudio del genoma humano y su diversidad, están permitiendo el desarrollo de nuevas aplicaciones y abordajes para realizar nuevos estudios clínicos que permiten reconocer datos puntuales en las patologías. En poco tiempo, se pasó de disponer únicamente de herramientas para el estudio de unos pocos genes que llevan a enfermedades identificadas mediante sospechas clínicas, a tener la posibilidad de realizar un análisis completo más exploratorio del genoma de un paciente y a construir mediante esta información, redes completas de genes, lo que lleva a tener un conocimiento más amplio.

8. 8 Gómez, AM., García-Robles, R., Suárez-Obando, F. Estimación de las frecuencias de las mucopolisacaridosis y análisis de agrupamiento espacial en los departamentos de Cundinamarca y Boyacá. *Biomédica*, 32(4), 602–9. 2012 <http://doi.org/10.7705/biomedica.v32i4.574>

Actualmente, el estudio de enfermedades huérfanas como MPS, mediante el uso de la genómica comparada se ha posicionado como un campo de la investigación biológica en el que los investigadores usan herramientas, como análisis computarizados, para comparar las secuencias del genoma completo, obteniendo así características propias de cada individuo y localizando también regiones de similitudes y diferencias. Toda esta información permite traducir los resultados de variantes secuenciales en efectos funcionales que explican la etiología de la enfermedad, ayuda a entender mejor la estructura y la función de los genes humanos, y permite crear nuevas estrategias para combatir diferentes enfermedades; específicamente, la MPS IV-A al tratarse de una enfermedad heredo metabólica multisistémica heterogénea y progresiva, requiere de un diagnóstico precoz, tratamiento oportuno, seguimiento y rehabilitación continua que mejoren la calidad y expectativa de vida de los pacientes, por esta razón la genómica comparativa de las variantes genéticas en pacientes con este síndrome permite profundizar en el conocimiento de la expresión fenotipo – genotipo, predicción clínica, respuesta al tratamiento con la TRE, la presencia o no de inmunogenicidad, el asesoramiento genético empleando herramientas moleculares para el estudio de portadores y búsqueda futura 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 en Colombia sobre la MPS IV-A aportan al conocimiento de esta enfermedad y ofrecen un apoyo desde lo científico, a la reglamentación y el manejo oportuno de las enfermedades huérfanas; por tanto, este proyecto busca aportar mediante el uso de las tecnologías genómicas comparativas, el análisis de las variantes exómicas de pacientes con MPS IV-A y fortalecer los datos existentes de la frecuencia poblacional de la enfermedad, obtener frecuencias alélicas y génicas en una muestra de pacientes del Suroccidente Colombiano.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Establecer la frecuencia poblacional de las variantes exómicas encontradas, mediante análisis de genómica comparativa entre una población sin hallazgos clínicos sugestivos de Síndrome de Morquio-A y un grupo de pacientes con diagnóstico enzimático y molecular de Síndrome de Morquio-A o MPS IV-A.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar las variantes génicas causantes de patogenicidad para MPS IV-A y su efecto poblacional.
- Caracterizar genómicamente las variantes exómicas encontradas en individuos afectados de MPS IV-A.
- Determinar la presencia y frecuencia de las variantes en el gen GALNS en una muestra de pacientes con diagnóstico de Síndrome de Morquio-A del Suroccidente Colombiano.
- Predecir Interacciones entre el gen GALNS y otros genes – moléculas pequeñas que modulen su expresión.
- Calcular las frecuencias alélicas y génicas de las variantes en el gen GALNS en las muestras analizadas.
- Inferir el efecto alélico de las variantes registradas en la población como un factor de riesgo a predecir MPS IV-A.

3. MARCO TEÓRICO

Las enzimas lisosomales son responsables del catabolismo de las biomoléculas. Las deficiencias en ellas, dan como resultado la acumulación de sustratos no degradados en los tejidos, lo que conduce finalmente a enfermedades de almacenamiento lisosómico. La galactosamina-6-sulfatasa lisosómica humana (GALNS, también conocida como N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa y GalN6S; EC 3.1.6.4) elimina los grupos sulfato de un N-acetilgalactosamina-6-sulfato terminal (o galactosa-6-sulfato) en mucopolisacáridos como keratán sulfato y condroitin-6-sulfato. Los defectos en GALNS conducen a la acumulación de sustratos, lo que resulta en el desarrollo de la enfermedad de almacenamiento lisosomal mucopolisacaridosis IV- A (también conocida como MPS IV A y enfermedad de Morquio A).⁹

El síndrome de Morquio-A o MPS IV-A, (OMIM 253000) es una enfermedad autosómica recesiva de almacenamiento lisosomal⁴, con una incidencia en la población general de 1: 201.000 NV, oscilando en varias poblaciones desde 1: 599,000 en Reino Unido⁵ 1: 300,000 nv en Italia.¹⁰ Estudios realizados por Gómez et al² en Colombia, propusieron que el síndrome de Morquio es la MPS más frecuente en el país con una incidencia de 0,68: 100.000 NV, siendo la segunda en frecuencia a nivel mundial, solamente superada por Irlanda del norte (1,3/100.000);¹¹ sin embargo, a pesar de los esfuerzos realizados por conocer y dar manejo puntual a la enfermedad, siguen existiendo brechas y falta de

9. 9 Rivera-Colón, Y., Schutsky, E. K., Kita, A. Z., & Garman, S.C. The structure of human GALNS reveals the molecular basis for mucopolysaccharidosis IV A. *Journal of Molecular Biology*, 423(5), 736–751. 2012 <http://doi.org/10.1016/j.jmb.2012.08.020>.

10. 10 Tomatsu S, Dieter T, Schwartz I V., Sarmient P, Giugliani R, Barrera LA, et al. Identification of a common mutation in mucopolysaccharidosis IVA: Correlation among genotype, phenotype, and keratan sulfate. *J Hum Genet*. 2004;49(9):490–4.

11. 11 Belloso WH, Redal MA. La farmacogenómica y el camino hacia la medicina personalizada. *Med (Buenos Aires)* [Internet]. Fundación Revista Medicina (Buenos Aires); [cited 2017 Jan 23];70(3):265–74. Available from: http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0025-76802010000300013&lng=es&nrm=iso&tlng=en

información concisa y concreta que lleven a determinar con exactitud la prevalencia poblacional de esta patología.

En la MPS IV-A, el trastorno de almacenamiento lisosomal causado por la deficiencia de actividad de la GALNS, genera alteración del catabolismo de dos GAGs: el C6S y KS a nivel de los condrocitos que son los responsables de la síntesis de los GAGs.¹²

3.1 EL GEN Y LA ENZIMA GALNS

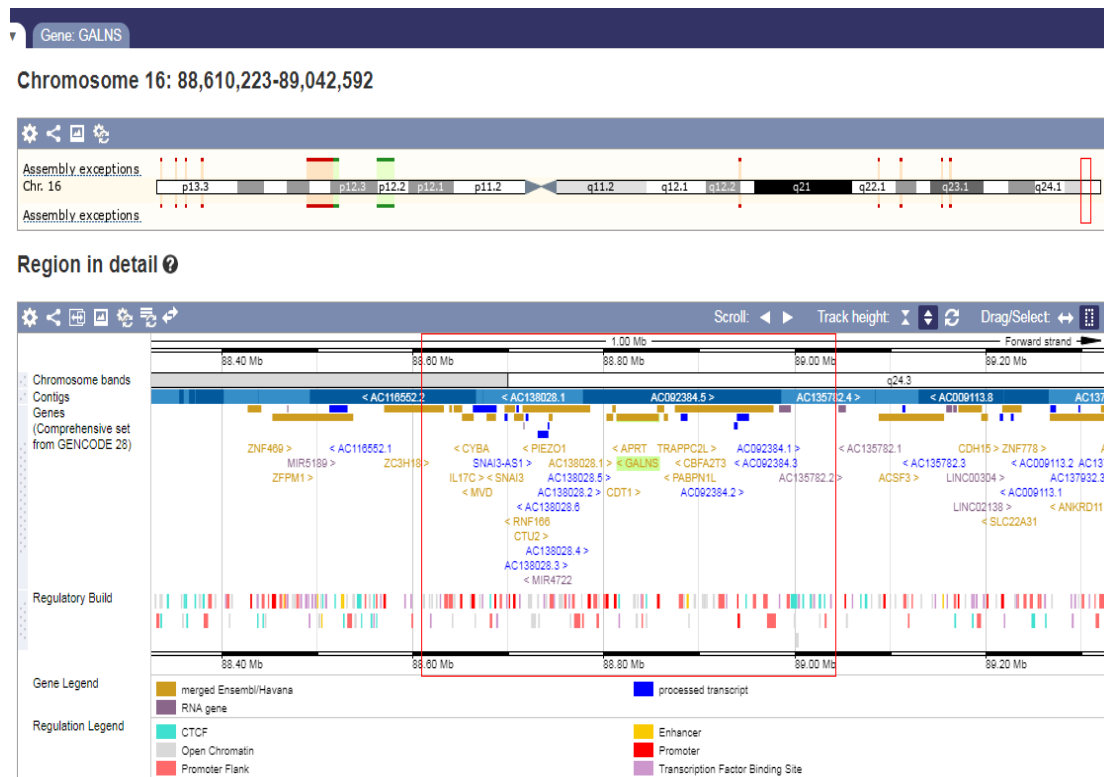
El gen humano GALNS se encuentra localizado en el cromosoma 16q24.3, posee una longitud de 50 kb con 14 exones y 13 intrones. Un ARNm de 2,3 kb es sintetizado a partir del gen GALNS, con un marco abierto de lectura de 1,5 kb que codifican para una proteína de 522 aminoácidos (6).

El contenido GC en la región reguladora 5', sumado a la ausencia de una caja TATA y la presencia de un alto número de sitios de unión para el factor de transcripción Sp1, sugieren que este es un gen de expresión constitutiva. Más de 200 mutaciones han sido identificadas en el gen GALNS, incluyendo mutaciones missense (69%), nonsense (5%), splicing (7%), deleciones pequeñas (13%) y grandes (2%), e inserciones (4%). El 46% de estas mutaciones ocurren menos de tres veces en el total de la población sugiriendo una elevada heterogeneidad molecular en las mutaciones sobre el gen GALNS. Para la población colombiana se identificaron las mutaciones p.G301C, p.S162F y p.F69V en pacientes del viejo Caldas, de las cuales la última no ha sido reportada en otras poblaciones. Posteriormente, las mutaciones p.A75G y p.R386C fueron identificadas en pacientes del departamento de Boyacá (Saboya y Chiquinquirá), de las cuales la primera no se ha identificado aún en otros pacientes latinoamericanos. A pesar de

12.12 Wood TC, Harvey K, Beck M, Burin MG, Chien YH, Church HJ, et al. Diagnosing mucopolysaccharidosis IVA. J Inherit Metab Dis. 2013;36(2):293–307.

la elevada heterogeneidad molecular de las mutaciones, se han observado algunas asociaciones genotipo-fenotipo. Así, la mayoría de las mutaciones puntuales están asociadas con fenotipos atenuados, mientras que mutaciones sin sentido, deleciones grandes y alteraciones tipo splicing se encuentran asociadas con fenotipos severos.¹

Figura 1. Localización Citogenética y Características del Gen GALNS



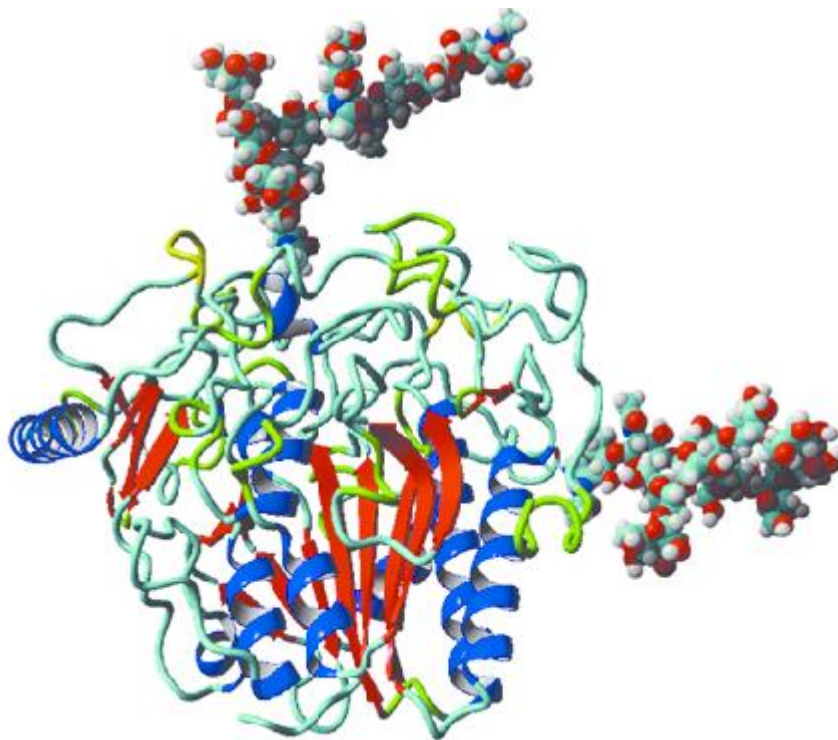
Fuente: www.ensembl.org.

La enzima GALNS es un homodímero de 120 kDa, con dos monómeros de 60 kDa que son procesados a polipéptidos con un peso molecular de 40 kDa y 15 kDa unidos por un enlace disulfuro. Al igual que otras enzimas y proteínas lisosomales, GALNS posee un péptido señal de 26 residuos que dirige la proteína naciente al RE, en donde es inicialmente modificada por glicosilación cotranslacional en dos asparaginas. Esta glicosilación involucra la transferencia en bloque de un

oligosacárido formado por tres glucosas, nueve manosas y 2 residuos de N-acetilglucosamina. Antes de salir del RE tres residuos de glucosa y uno de manosa son removidos del oligosacárido. Antes de ser plegada en el RE, GALNS es activada por la enzima generadora de formilglucina (FGE). Esta es una enzima del RE responsable de la conversión de cisteína a formilglucina en el sitio activo de las sulfatasas, representado por la secuencia consenso CXPSRXXX [L/M]TG[R/K/L] y ubicado en el extremo N-terminal de la proteína. Para el caso específico de GALNS humana el sitio activo se encuentra en la posición C79. FGE es codificada por el gen SUMF1 (Sulfatase Modifying Factor 1). Este gen es un factor limitante y esencial en la actividad de las sulfatasas por las siguientes razones: (i) mutaciones en SUMF1 producen la deficiencia múltiple de sulfatasas, en donde la actividad de todas las sulfatasas se encuentra afectada, (ii) la sobreexpresión de una sulfatasa produce activación parcial de la enzima y disminución en la actividad de otras sulfatasas por saturación del sistema, y (iii) la coexpresión de una sulfatasa con SUMF1 lleva a un marcado incremento en la actividad de la respectiva sulfatasa. A diferencia de las proteínas de membrana o de la ruta secretora, en las que las cadenas de oligosacáridos son procesadas a unidades que contienen ácido siálico, las enzimas lisosomales son modificadas por la adición de residuos de fosfomanosil, el cual funciona como un componente esencial en el reconocimiento del receptor de manosa-6-fosfato en Golgi. Una vez llevadas a cabo estas modificaciones sobre la cadena de oligosacáridos, la enzima se une al receptor de manosa-6-fosfato y abandona el retículo de Golgi en vesículas recubiertas de clatrina, que la dirigen al sistema endosomal/lisosomal. Cerca del 2 al 20% de la enzima es secretada antes de llegar al lisosoma, la cual puede ser recapturada de manera autocrina o paracrina por unión con receptores de manosa-6-fosfato ubicados en la membrana celular. Esta capacidad de captura celular y direccionamiento al lisosoma constituyen la base para el desarrollo de terapias de reemplazo enzimático, génica y celular.¹

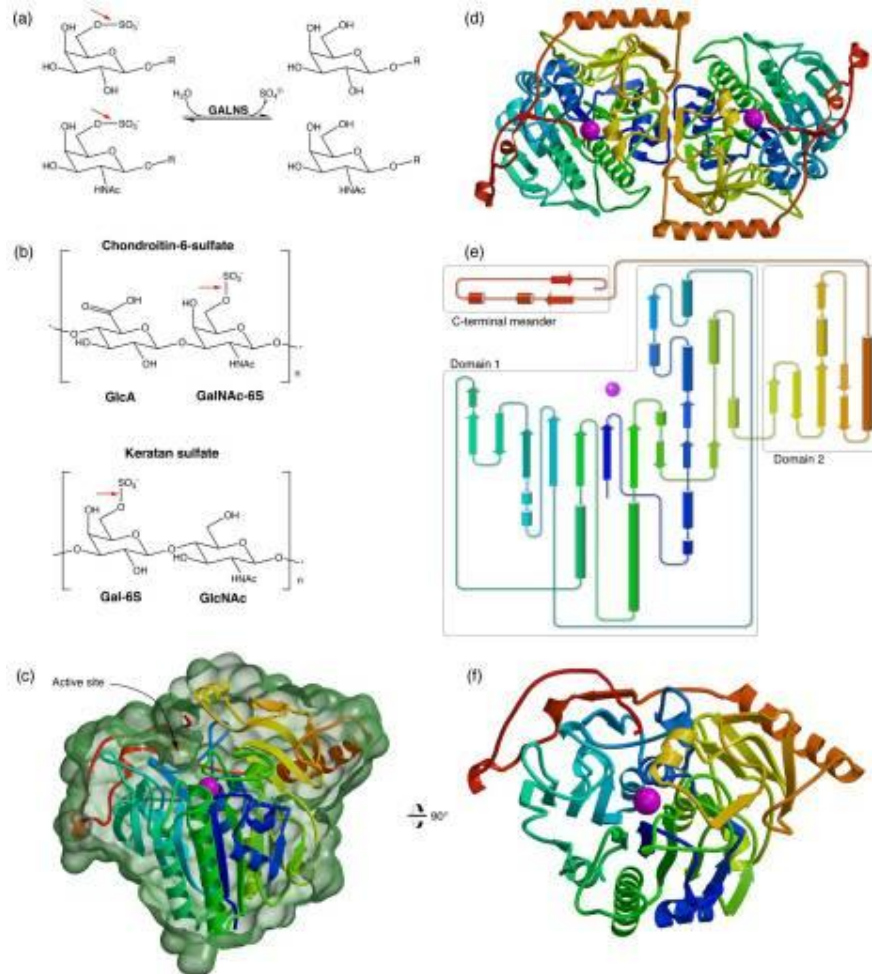
Como resultado de la deficiencia enzimática, los GAGs parcialmente degradados se acumulan en los huesos, ligamentos y cartílagos, así como la MEC de estos tejidos, impidiendo la osificación endocondral y la condrogénesis.¹⁻¹³

Figura 2. Estructura Terciaria de GALNS. La predicción de la estructura terciaria se realizó empleando el servidor I-tasser (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>). La predicción de los dos posibles sitios de glicosilación, así como la generación del modelo glicosilado fueron realizados con la herramienta GlyProt



Fuente: Tomatsu S, Fukuda S, Cooper A, et al. Fourteen novel mucopolysaccharidosis IVA producing mutations in GALNS gene. Hum Mutat.1997;10:368–375.

Figura 3. El GALNS humano y su estructura general



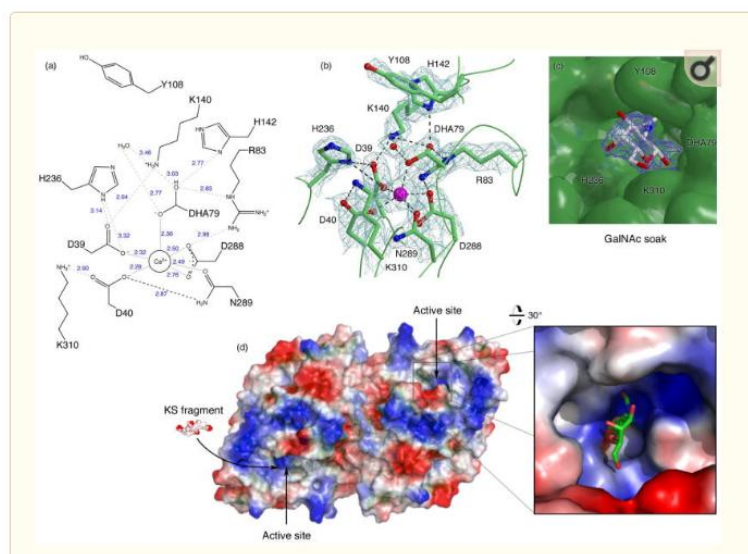
(a): GALNS escinde el 6-sulfato unido a los sacáridos Gal y GalNAc. (b): los sustratos GALNS incluyen condroitin-6-sulfato y keratan sulfato. Las flechas rojas muestran el enlace escindido por GALNS. (c): estructura del monómero GALNS coloreada de azul a rojo desde el extremo N al C y al Ca^{2+} en magenta. (Este esquema de coloración se combina en paneles posteriores). La superficie molecular en verde (calculada en Povscript43) se corta para indicar la zona que define el sitio activo. (d): una visión general de la estructura del dímero GALNS vista abajo de la díada molecular. (e): un diagrama de topología del monómero muestra los dominios en gris. (f): una vista ortogonal del monómero GALNS visto en la hoja β grande en el dominio 1. (33)

Fuente. Rivera-Colón, Y., Schutsky, E. K., Kita, A. Z., & Garman, S. C. The structure of human GALNS reveals the molecular basis for mucopolysaccharidosis IV A. *Journal of Molecular Biology*, 423(5), 736–751 2012. <http://doi.org/10.1016/j.jmb.2012.08.020>.

3.2 EL SITIO ACTIVO Y LA UNIÓN DEL LIGANDO

El sitio activo de GALNS se encuentra en un bolsillo en el centro del dominio α / β N-terminal. Los residuos primarios del sitio activo incluyen Asp39, Asp40, Arg83, Tyr108, Lys140, His142, His236, Asp288, Asn289, Lys310, y DHA 79. El sitio activo contiene una alta concentración de residuos básicos que conducen a un considerable potencial electrostático positivo en la superficie, como se espera para una enzima que se une a sustratos altamente sulfatados. (Figura 4)⁶

Figura 4. El sitio activo y la unión del ligando del GALNS.



(a) Representación esquemática de las interacciones en el sitio activo de GALNS. (b) Mapa 2Fo-Fc residuos del sitio activo contorneados en 1.8σ . (c) La estructura del ligando unido. La densidad electrónica muestra un mapa 2Fo-Fc. La superficie molecular muestra la gran cavidad de unión al sustrato con los residuos indicados. (d) El potencial de la superficie electrostática de GALNS, se muestran las grandes áreas de carga positiva adecuadas para interactuar con sustratos polianiónicos. Un fragmento del sustrato queratán sulfato (con la etiqueta «fragmento KS») se muestra para la escala.

Fuente. Rivera-Colón, Y., Schutsky, E. K., Kita, A. Z., & Garman, S. C. The structure of human GALNS reveals the molecular basis for mucopolysaccharidosis IV A. *Journal of Molecular Biology*, 423(5), 736–751 2012. <http://doi.org/10.1016/j.jmb.2012.08.020>.

3.3 MANIFESTACIONES CLÍNICAS

Las manifestaciones clínicas de la MPS IV-A varían desde una forma severa caracterizada por displasia ósea grave y sistémica presente en el momento del nacimiento a una forma menos severa, caracterizada por afectación ósea progresiva debido a la acumulación de GAGs. No hay afección primaria del sistema nervioso central, pues en este no hay acumulación significativa de GAGs y la inteligencia es normal; Los fenotipos de la MPS IV-A varían desde la forma clásica que se manifiesta con anomalías esqueléticas y articulares (hipermovilidad articular, enanismo, tronco corto y anomalías de la columna cervical)¹⁴⁻¹⁵ pérdida de la audición, afectación cardíaca a nivel valvular, opacidad corneal y una esperanza de vida de 20-30 años menos que en la forma atenuada.¹⁶ Las manifestaciones respiratorias y de la voz se dan como una consecuencia de los depósitos de GAGs en la vía aérea superior. La obstrucción de la vía aérea superior y la apnea obstructiva del sueño, combinadas con la deformidad de la caja torácica y la distorsión traqueal se dan como resultado del acortamiento de la columna vertebral, y a menudo conducen al colapso total de la vía aérea.¹⁷⁻¹⁸ En conjunto, estas anomalías resultan en problemas respiratorios¹⁹ trastornos de voz

14. 14 Tomatsu S, Nishioka T, Montañó AM, Gutierrez MA, Pena OS, Orii KO, et al. Mucopolysaccharidosis IVA: identification of mutations and methylation study in GALNS gene. J Med Genet [Internet]. 2004;41(7):e98. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1735846&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
15. 15 Tomatsu S, Montañó AM, Nishioka T, Gutierrez MA, Peña OM, Tranda Fireescu GG, et al. Mutation and polymorphism spectrum of the GALNS gene in mucopolysaccharidosis IVA (Morquio A). Hum Mutat [Internet]. 2005 Dec [cited 2016 Feb 27];26(6):500–12. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16287098>
16. 16 Wang Z, Zhang W, Wang Y, Meng Y, Su L, Shi H, et al. Mucopolysaccharidosis IVA mutations in Chinese patients: 16 novel mutations. J Hum Genet [Internet]. Nature Publishing Group; 2010;55(8):534–40. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20574428>
17. 17 Dũng VC, Tomatsu S, Montañó AM, Gottesman G, Bober MB, Mackenzie W, et al. Mucopolysaccharidosis IVA: correlation between genotype, phenotype and keratan sulfate levels. Mol Genet Metab [Internet]. Elsevier; 2013 Jan 1 [cited 2016 Feb 11];110(1–2):129–38. Available from: <http://www.mgmjournal.com/article/S1096719213002102/fulltext>
18. 18 Morrone A, Caciotti A, Atwood R, Davidson K, Du C, Francis-Lyon P, et al. orquio a syndrome-associated mutations: A review of alterations in the GALNS gene and a new locus-specific database. Hum Mutat. 2014;35(11):1271–9.
19. 19 Tomatsu S, Montan AM, Lopez P, Trandafirescu G. Determinant factors of spectrum of missense variants in mucopolysaccharidosis IVA gene. 2006;89:139–49.

y del habla.¹³ Debido a la naturaleza progresiva del síndrome de Morquio A, el diagnóstico temprano es primordial para optimizar los resultados clínicos del paciente.

Hasta el año 2013, no existía ningún tipo de tratamiento para prevenir, ó tratar el síndrome de Morquio A, por lo que las intervenciones médicas se limitaban al alivio sintomático, que incluía la rehabilitación física, uso de analgésicos para el dolor y cirugías de miembros inferiores, entre otras. A la luz de la fisiopatología de la enfermedad, en la cual la deficiencia de una única enzima da lugar a una gran variedad de manifestaciones clínicas, aparece la TRE, por medio de la cual una administración intravenosa de la enzima recombinante humana GALNS,²⁰ reemplaza la enzima deficiente. Esta terapia fue aprobada en el año 2014 por la FDA de EE.UU y su uso se considera seguro, con pocas reacciones de hipersensibilidad y raros casos de anafilaxia.²¹ Nos encontramos entonces ante una patología que presenta una variedad de signos y síntomas, así como variantes genéticas, lo que hace a estos individuos más susceptibles a presentar diferentes y múltiples respuestas a la que hasta ahora es su única terapia específica establecida y aprobada.

Según el informe de EURORDIS, el 80% de las enfermedades raras son de origen genético, presentando un amplio espectro de variabilidad fenotípica y abarcando todas las variantes intermedias posibles entre las formas graves y leves de las enfermedades; de ahí, la gran importancia que tiene para la investigación de este conjunto de enfermedades, implementar nuevas herramientas genómicas como aproximación diagnóstica, buscando entender aspectos fundamentales de las patologías y brindar un adecuado manejo clínico de las mismas. Hoy en día, la investigación de enfermedades como el síndrome de Morquio-A, basada en el uso

20. 20 Tomatsu S, Brusius A, Smith M, Orii T, Montan AM. Growth Charts for Patients Affected With Morquio A Disease. 2008;1295:1286–95.

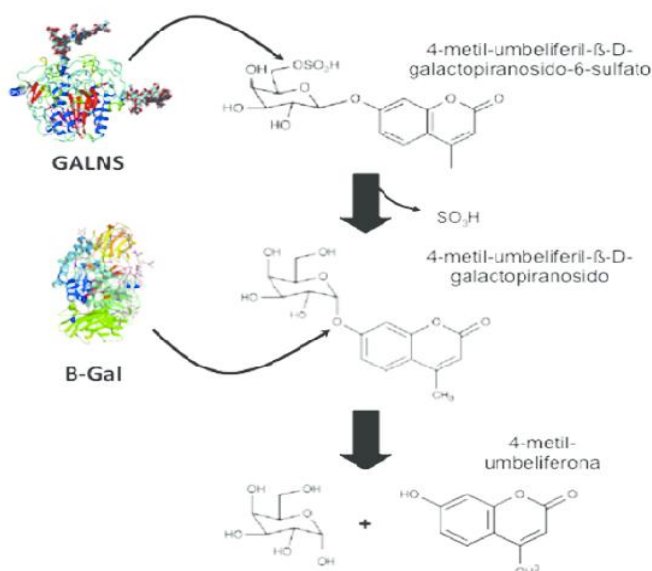
21. 21 Su JL, Katherine A, Su B, Santos CV, Contreras-garc GA. Caracterización clínica, estudios genéticos, y manejo de la Mucopolisacaridosis tipo IV A. Medicas UIS. 2013;2b(2):34–50

de herramientas como la genómica comparativa, permite reconocer la diversa interacción entre las redes génicas presentes en los pacientes afectados por la deficiencia enzimática y da bases moleculares para explicar los mecanismos y la fisiopatología de la enfermedad, abriendo así un campo de enormes posibilidades para definir lo que serán las bases de nuevas terapias génicas.

3.4 DIAGNÓSTICO ENZIMÁTICO DE LAS MPS IV-A

El diagnóstico definitivo de MPS IV-A, se establece por la medición de la actividad de la enzima GALNS en leucocitos o cultivos de fibroblastos, por lo general por un método colorimétrico o fluorométrico.⁹ Los leucocitos aislados de sangre entera permiten un análisis más rápido que el cultivo de fibroblastos, pues el tiempo desde la toma de muestras a la notificación de los resultados es menor de dos semanas. Como la enzima GALNS actúa sobre dos sustratos, se usan como sustratos N-acetilgalactosamina-6-sulfato (GalNAc-6S) y galactosa-6-sulfato (Gal-6S) para medir su actividad GalNAc-6S.

Figura 5. Reacción enzimática para la cuantificación de la enzima GALNS.



Fuente. Díaz JC, Suárez MA, Tomatsu SA. Contribución Colombiana Al Conocimiento Colombian Contribution To Knowledge. Issn. 2012;34(3):221–41.

3.5 GENÉTICA MOLECULAR DE LA MUCOPOLISACARIDOSIS TIPO IV-A.

Tomatsu y colaboradores en 1992 realizaron los primeros reportes de mutación en el gen GALNS, identificando 4 mutaciones diferentes (612,222.0001 - 612222,0004).²² Posteriormente Hori et al (1995) encontraron en pacientes japoneses 2 deleciones en estado de heteroalélico separadas por casi 8,0 y 6,0 kb en el gen GALNS con elementos repetitivos Alu, cerca de los puntos de deleción 8,0 kb; lo que había dado lugar a una deleción a partir de una recombinación Alu-Alu. La otra deleción de 6,0 kb involucraba eventos de recombinación entre repeticiones directas cortas e incompletas de 8 pb en los puntos de deleción. Esta fue la primera documentación de una doble deleción en un gen que no es miembro de un grupo de genes. Uno de los pacientes fue homocigoto para la deleción doble, y los otros eran heterocigotos;²³ en estos pacientes heterocigotos, Tomatsu et al. (1996) identificaron nuevas mutaciones en el gen GALNS en el otro alelo: 1 nonsense y 3 missense.²⁴

En el año 2004, Tomatsu y colaboradores analizaron el gen GALNS de 28 pacientes con MPS-IVA de diversas poblaciones étnicas donde se identificaron 32 mutaciones diferentes; las mutaciones transicionales en dinucleótidos CpG, representaron el 23% de todas las sustituciones de una sola base que conducían a mutaciones missense y nonsense en la región codificante, la metilación individual de citosina en CpG era extensa dentro de los exones 2-14 mientras que las citosinas en CpG del exón 1 no estaban metiladas.²⁵ Este estudio proporcionó

22. Politei J, Schenone AB, Guelbert N, Fainboim A, Szlago M. Enfermedad de Morquio (mucopolisacaridosis IV-A): aspectos clínicos , diagnósticos y nuevo tratamiento con terapia de reemplazo enzimático. 2015;113(4):359–64.

23. Hendriksz CJ, Berger KI, Giugliani R, Harmatz P, Kampmann C, Mackenzie WG, et al. International guidelines for the management and treatment of Morquio a syndrome. Am J Med Genet Part A. 2015;167(1):11–25.

24. Gutiérrez-Clavería M, Beroíza W T, Cartagena S. C, Cavides S. I, Céspedes G. J, Gutiérrez-Navas M, et al. Prueba de caminata de seis minutos. Doc Man Procedimientos Ser Chile. 2008;15–24.

25. Crapo RO, Casaburi R, Coates AL, Enright PL, MacIntyre NR, McKay RT, et al. ATS statement: Guidelines for the six-minute walk test. Am J Respir Crit Care Med. 2002;166(1):111–7.

un ejemplo de la correlación entre la metilación de los sitios CpG y la distribución de las mutaciones transicionales de este gen.

Hacia el 2005, se reportaron 148 mutaciones en el gen GALNS, incluyendo 26 mutaciones nuevas; de los alelos analizados, el 78,4% de las mutaciones eran missense, 9,2% delecciones pequeñas, 5,0% nonsense 2,4%; eran delecciones grandes y 1,6% inserciones. Las mutaciones de transición en dinucleótidos CpG representaron el 26,4% del total de las mutaciones descritas. Lo cual demostró la heterogeneidad alélica asociada a la amplia variabilidad clínica de la mucopolisacaridosis IV-A.²⁶

En el año 2010, Wang et al, realizaron secuenciación directa por PCR de exones en 24 pacientes chinos, donde se identificaron un total de 42 alelos mutantes, pertenecientes a 27 mutaciones diferentes. De las 27 mutaciones, 16 eran nuevas, incluyendo 2 mutaciones del splicing (c.567-1G4T y c.634-1G4A), 2 mutaciones nonsense (p.W325X y p.Q422X) y 12 mutaciones missense (p.T88I, p.H142R, p.P163H, p.G168L, p.H236D, p.N289S, p.T312A, p.G316V, p.A324E, p.L366P, p.Q422K y p.F452L).²⁷ La mutación p.G340D era una mutación común en los pacientes chinos con MPS IV-A, representando el 16,7% del número total de alelos mutantes, estos resultados mostraron que las mutaciones en estos pacientes tienen un espectro de mutación diferente en comparación con los de otras poblaciones, lo cual sugiere un efecto fundador.

Hasta el año 2014, el análisis molecular de diferentes poblaciones étnicas había revelado 185 mutaciones diferentes del gen GALNS, incluyendo 19 mutaciones nuevas reportadas en un estudio de correlación entre genotipo-fenotipo y los

26.26 Harmatz P, Mengel KE, Giugliani R, Valayannopoulos V, Lin SP, Parini R, et al. The Morquio A Clinical Assessment Program: Baseline results illustrating progressive, multisystemic clinical impairments in Morquio A subjects. *Mol Genet Metab* [Internet]. Elsevier Inc.; 2013;109(1):54–61. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymgme.2013.01.021>

27.27 Burkhalter N. Evaluación de la escala Borg de esfuerzo percibido aplicada a la rehabilitación cardíaca. *Rev Lat Am Enfermagem*. 1996;4(3):65–73.

niveles de KS realizado por Dũng et al año 2016, evidenciando así la amplia heterogeneidad alélica de mutaciones de gen GALNS, consistente con el amplio espectro de fenotipos clínicos observados en los pacientes.²⁸

Las alteraciones del gen GALNS asociados con Morquio A son numerosas y heterogéneas, además de forma continua se reportan alteraciones nuevas. Para ayudar a la detección e interpretación de las alteraciones de GALNS, desde la investigación previamente publicada, Morrone y colaboradores año 2014, realizaron una lista completa y actualizada desde el año 2005 hasta 277 alteraciones únicas asociadas al gen GALNS e identificados a partir de los 1.091 alelos publicados;²⁹ mostrando de esta manera una tabla con los 10 Alelos del gen GALNS más frecuentemente reportados en pacientes con Morquio A, por países y etnias. (tabla 2); así mismo, estudiaron a 37 pacientes italianos los cuales reportaron 14 nuevas mutaciones, en donde los procedimientos de secuenciación convencionales no lograron caracterizar una segunda mutación causante de la enfermedad en el 16% de los pacientes, y con procedimientos moleculares como CNV QF-PC, lograron caracterizar dos nuevas deleciones grandes con sus puntos de corte correspondientes en un 67% de los alelos del gen GALNS.³⁰

En el año 2016, Chkioua y colaboradores realizaron por análisis de secuencia directa, el cribado de la mutación del gen GALNS a 15 pacientes con MPS-IVA no emparentados; encontrando una mutación sin sentido p.D288G (c.863A> G) en un paciente, la mutación con mayor frecuencia c.120 + 1G> A (IVS1 + 1G> A) en once pacientes y tres mutaciones notificadas previamente p .G66R, p.A85T y p.R386C en los otros pacientes. Todos los pacientes estudiados fueron

28.28 Sáenz H, Barrera L. La terapia de reemplazo enzimático en el tratamiento de enfermedades genéticas. Univ Sci [Internet]. 2003;8:31–42. Available from: <http://revistas.javeriana.edu.co/index.php/scientarium/article/view/4738>

29.29 Schweighardt B, Tompkins T, Lau K, Jesaitis L, Qi Y, Musson DG, et al. Immunogenicity of Elosulfase Alfa, an Enzyme Replacement Therapy in Patients With Morquio A Syndrome: Results From MOR-004, a Phase III Trial. Clin Ther. 2014;1137–47.

30.30 Jones SA, Bialer M, Parini R, Martin K, Wang H, Yang K, et al. Safety and clinical activity of elosulfase alfa in pediatric patients with Morquio A syndrome (mucopolysaccharidosis IVA) less than 5 years. Pediatr Res [Internet]. 2015;78(6):10–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/pr.2015.169>

homocigotos para estas mutaciones identificadas. El análisis bioinformático predijo la nueva mutación como probablemente patógena. Estos hallazgos con la mutación p.D288G no observada en sujetos controles, sugirieron que es una mutación causante de enfermedad, que se correlacionó con el fenotipo severo observado en los pacientes y se encontró que las dos mutaciones GALNS no reportadas e informadas, respectivamente p.D288G y p.R386C, se asociaron con un haplotipo común y específico.³¹ Finalmente, en el 2017 se detectó en una niña china afecta con MPS-IVA mediante PCR y secuenciación Sanger, una nueva mutación sin sentido heterocigota compuesta, c.1094G> T (p.Gly365Val) / c.938C> T (p.Thr313Met), en el gen GALNS, la cual muy probablemente subyace a la patogénesis de la enfermedad del paciente (28).

Tabla 1. Los 10 Alelos del gen GALNS más frecuentemente reportados en pacientes con Morquio A, por Países / Etnias.

Allele	Number detected	Percentage of that allele's total	Percentage of all detected alleles
p.Arg386Cys	55	100	5.0
Spanish	9	16	0.8
Argentine	6	11	0.5
Chinese	5	9	0.5
Italian	4	7	0.4
Colombian	3	5	0.3
Polish	3	5	0.3
Turkish	3	5	0.3
Chilean	3	5	0.3
All other countries/ethnicities	14	35	1.3
p.Ile113Phe	52	100	4.8
Irish	27	52	2.5
British	15	29	1.4
British/Irish	3	6	0.3
All other countries/ethnicities	7	13	0.6
p.Gly301Cys	45	100	4.1
Colombian	16	36	1.5

Continuación Tabla 1. Los 10 Alelos del gen GALNS más frecuentemente reportados en pacientes con Morquio A, por Países / Etnias.

31. 31 Schweighardt B, Tompkins T, Lau K, Jesaitis L, Qi Y, Musson DG, et al. Immunogenicity of Elosulfase Alfa, an Enzyme Replacement Therapy in Patients With Morquio A Syndrome: Results From MOR-004, a Phase III Trial. Clin Ther [Internet]. Elsevier; 2015 May 1 [cited 2016 Mar 1];37(5):1012–1021.e6. Available from: <http://www.clinicaltherapeutics.com/article/S0149291814007413/fulltext>

Allele	Number detected	Percentage of that allele's total	Percentage of all detected alleles
Portuguese	6	13	0.5
Spanish	5	11	0.5
All other countries/ethnicities	10	40	0.9
c.120+1G>A	22	100	2.0
Tunisian	20	91	1.8
All other countries/ethnicities	2	9	0.2
p.Thr312Ser	22	100	2.0
Irish	14	64	1.3
British/Irish	3	14	0.3
All other countries/ethnicities	5	23	0.5
p.Met391Val	22	100	2.0
French Canadian	7	32	0.6
French	4	18	0.4
Canadian Caucasian	3	14	0.3
American caucasian, German	2	9	0.2
All other countries/ethnicities	6	27	0.5
p.Ala291Thr	20	100	1.8
Asian-multiethnic	8	40	0.7
British	4	20	0.4
Finnish	3	15	0.3
Pakistani	2	10	0.2
Chinese	1	5	0.1
Japanese	1	5	0.1
All other countries/ethnicities	1	5	0.1
p.Ser287Leu	20	100	1.8
Middle Eastern	4	20	0.4
Turkish	3	15	0.3
Spanish	2	10	0.2
Polish	2	10	0.2
Greek	2	10	0.2
Macedonian	2	10	0.2
Austrian	1	5	0.1
New Zealander	1	5	0.1
Irish/Italian/Polish	1	5	0.1
All other countries/ethnicities	2	10	0.2
p.Met318Arg	19	100	1.7
Chinese	11	58	1.0
Taiwanese	3	16	0.3
Other	2	11	0.2
South-East Asian	2	11	0.2
Japanese	1	5	0.1
p.Arg253Trp	18	6	1.6
Pakistani	16	89	1.5
All other countries/ethnicities	2	11	0.2

Fuente. Morrone A, Caciotti A, Atwood R, Davidson K, Du C, Francis-Lyon P, et al. Morquio a syndrome-associated mutations: A review of alterations in the GALNS gene and a new locus-specific database. Hum Mutat.2.014

4. METODOLOGÍA

4.1 TIPO DE ESTUDIO

Estudio descriptivo en donde se caracterizan genómicamente las variantes exómicas encontradas en individuos afectados de MPS IV-A, y se realiza un análisis de genómica comparativa con una población sin hallazgos clínicos sugestivos de Síndrome de Morquio-A y se determina su frecuencia poblacional en una muestra del Suroccidente Colombiano.

4.2. GENÓMICA COMPARATIVA DE LAS VARIANTES EXÓMICAS DE PACIENTES CON MPS IV-A.

4.2.1 Población de Estudio

Para el presente estudio se tomaron los resultados obtenidos para el diagnóstico confirmatorio de MPS IV-A de 16 pacientes pertenecientes a la Fundación para la Prevención de la Discapacidad “FUNDIS “del Suroccidente Colombiano, y todos los resultados exómicos de pacientes con patologías diferentes y no diagnosticados clínicamente con MPS IV-A, pertenecientes a la base de datos del Instituto de Genética Médica – GENOMICS (Cali), previa firma de consentimiento informado.

4.2.2 Criterios de Inclusión

Diagnóstico clínico, enzimático y molecular de Morquio A (para los pacientes afectados) y Diagnóstico de patologías diferentes a Morquio A (para los exomas de referencia) obtenido de base de datos del Instituto de Genética Médica – GENOMICS (Cali),

4.2.3. Criterios de Exclusión

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

4.2.4. Diagnóstico Enzimático de la MPS IV-A

Para el diagnóstico enzimático a cada paciente, se le extrajo muestra de sangre venosa periférica colectada en papel de filtro y se midió la actividad enzimática de GALNS mediante espectrometría de masas en tándem cuyo procesamiento se realizó en el laboratorio GENOMICS de la ciudad de Cali Valle del Cauca en coordinación y apoyo de la Universidad de Rostock, Alemania.

4.2.5. Diagnóstico Molecular de la MPS IV-A.

Para el diagnóstico molecular a cada paciente se extrajo ADN a través de punción digital periférica con la extracción de 2 gotas de sangre y fijación en papel filtro, se extrajo ADN, se aisló el gen y se amplificó mediante PCR, se secuenció mediante NGS, cuyo procesamiento se realizó en la Universidad de Rostock, Alemania en coordinación y apoyo del Instituto GENOMICS de la ciudad de Cali Valle del cauca

4.2.6. Análisis Bioinformático

Para el análisis de las variantes encontrada en el gen GALNS se realizó una búsqueda exhaustiva de todas las variantes encontradas, para lo cual se utilizaron las siguientes bases de datos, con el objetivo de comprobar si estas habían sido previamente descritas además de conocer su significado patogénico:

- Human Gene Mutation Database (HGMD) (<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>). Existe información sobre gran cantidad de enfermedades

hereditarias. Permite conocer citas bibliográficas de cada variante, analiza las propiedades biofísicas de los aminoácidos sustituidos, realiza análisis de conservación (PSI-BLAST) y calcula predicciones de algunos estudios in silico (SIFT y MutPred).

- Leiden Open Variation Database (LOVD) (<http://www.lovd.nl/3.0/home/>). Se trata de una base de datos pública desarrollada por Leiden University Medical Center en Holanda. Tiene información sobre una gran cantidad de genes e información importante sobre citas bibliográficas, además está diseñada para recopilar datos sobre los individuos en los cuales ha sido hallada la variante.
- National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Plataforma pública estadounidense 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.

Se utilizó la base de datos dbSNP (repositorio central tanto para sustituciones como pequeñas eliminaciones e inserciones de bases de nucleótidos únicos) para obtener 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 fue creada para dar soporte al descubrimiento de polimorfismos a gran escala,

como el del proyecto HapMap, pero enseguida fue considerado como repositorio mundial también para otros tipos de variaciones.

- Ensembl Genome Browser

(<http://www.ensembl.org/index.html>).

Otra muestra de los enormes esfuerzos públicos por proveer de recursos genómicos a la comunidad científica es el del proyecto Ensembl que, aunque con enfoque particular en el genoma humano, contiene información de otros genomas cordados de muchos organismos modelos como el ratón, la rata o el pez cebra. 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.

4.2.5 Métodos in Silico

Hoy en día, existen varias herramientas bioinformáticas, métodos in silico, disponibles que pueden predecir las consecuencias de las variantes genéticas en la estructura y función de las proteínas. Estos métodos in silico estudian varias características como son los 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.

4.2.5.1 Métodos Bayesianos

4.2.5.1.1 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.

PolyPhen-2 predice el significado funcional de la variación mediante un clasificador Naïve Bayes. Para ello hace uso de dos pares de conjuntos de datos con los que trabaja el clasificador. Por una parte, usa el conjunto de datos HumDiv, que está formado por los alelos dañinos 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. Por otra, está el conjunto 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. El 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, posiblemente dañina y probablemente dañina, basándose en la probabilidad de patogenicidad dada por el clasificador de Bayes. 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.

4.2.5.1.2 Mutation Taster

Mutation Taster (<http://www.mutationtaster.org/>), a diferencia de los algoritmos anteriores, 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.

4.2.5.2 Métodos de análisis de conservación

El 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.

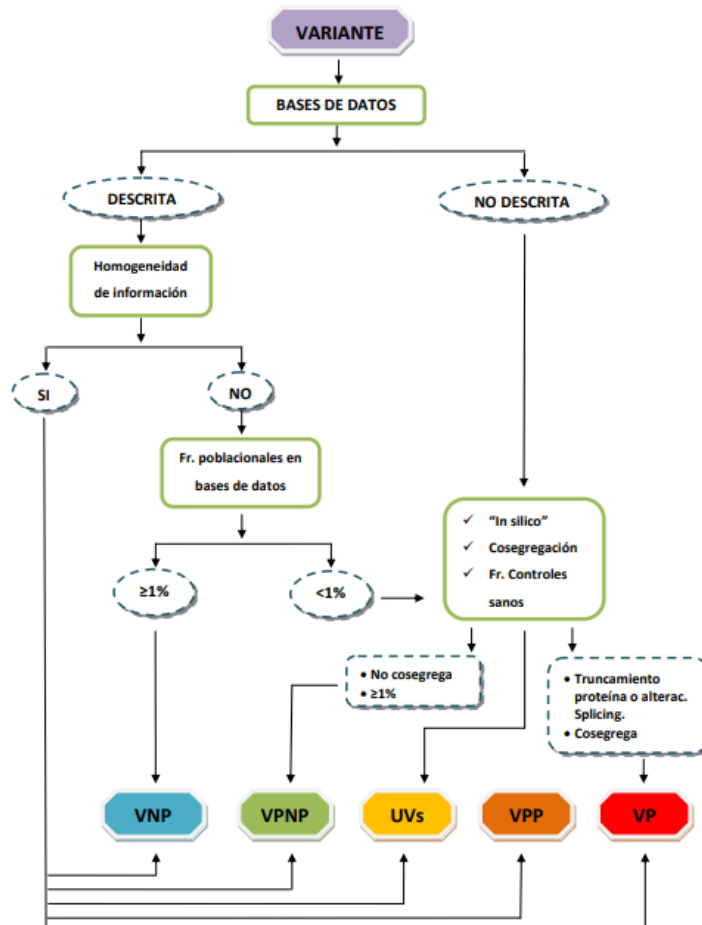
Se introduce la secuencia a analizar en formato FASTA y el programa primero busca secuencias similares a la introducida por nosotros, después escoge secuencias estrechamente relacionadas que puedan tener una función similar a la nuestra, y luego obtiene el alineamiento de las secuencias escogidas. Por 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.

Tras la búsqueda exhaustiva en todas estas bases de datos, clasificamos las variantes de la siguiente manera (ver algoritmo en Figura 1):

- Variantes Patogénicas (VP): Aquellas variantes con información contrastada de su patogenicidad en las distintas bases de datos.
- Variantes Probablemente Patogénicas (VPP): Aquellas de nueva descripción que causan un codón de parada prematuro y truncamiento de la proteína o aquellas que presentan una clara cosegregación con la enfermedad y/o están ausentes en controles sanos o en una extensa cohorte de pacientes (frecuencia en la población <1%). Las nuevas variantes encontradas son frecuentemente clasificadas como UVs debido a la falta de información sobre la frecuencia de la variante en la población general.
- Variantes de Efecto Clínico Desconocido (UVs): Aquellas variantes en las que se desconoce todavía su clasificación por falta de estudios que lo corroboren y además, que no cumplan los criterios de probabilidad de no patogenicidad propuestos.
- Variantes Probablemente No Patogénicas (VPNP): Aquellas variantes que han sido descritas previamente, presentan una frecuencia en la población <1% y que se consideran neutras desde el punto de vista de los métodos de predicción de patogenicidad.

- Variantes No Patogénicas o Polimorfismo (VNP): Son aquellas en las que la frecuencia en la población general es $>1\%$ y no presentan ninguna sospecha de patogenicidad.¹⁷.

Figura 6. Algoritmo usado para la interpretación de las variantes detectadas en este estudio.



Fuente. Morrone A, Caciotti A, Atwood R, Davidson K, Du C, Francis-Lyon P, et al. Morquio a syndrome-associated mutations: A review of alterations in the GALNS gene and a new locus-specific database. Hum Mutat. 2014;35(11):1271–9. Modificado de LMM: Laboratory for Molecular Medicine y LSDBs: Locus Specific Databases, bases de datos.

4.2.6 Cálculo de frecuencias génicas y alélicas

Todos los Exomas registrados y pertenecientes al big data del Instituto de Genética Médica – GENOMICS (Cali), un total de 100 pacientes, se les buscó mutaciones en el gen GALNS; cada una de las variantes encontradas se tabuló según su posición, cambio de nucleótido, cambio de aminoácido, significado clínico, frecuencia génica, frecuencia alélica y referencia en NCBI.

La frecuencia génica se calculó dividiendo el número de alelos totales encontrados para cada variante sobre el número total de pacientes evaluados. Por su parte, la frecuencia alélica para las variantes reportadas, se tomaron según los datos existentes en el Clinvar y ExAC, y para aquellas variantes no reportadas se usó la ecuación:

$p^2+2pq+q^2$, donde:

p^2 = alelos en individuos homocigotos con un polimorfismo n

$2pq$ = frecuencia predicha para heterocigotos

q^2 = alelos en individuos homocigotos con un polimorfismo m³²

Para el estudio de asociación - diferencia entre frecuencias génicas de pacientes con MPS IV A y los de no afectados, se utilizó la prueba de Fisher, el cual nos permitirá estudiar si existe asociación entre las variables cualitativas, en un número de eventos esperados.³³ Se asumió el equilibrio de Hardy-Weinberg para las variantes no reportadas por que se trabajó con una población sin hallazgos clínicos sugestivos de MPS IVA , por lo tanto las variantes del gen GALNS son de naturaleza neutra.

32.32 Hammer, Ø., Harper, D.A.T & Ryan, P.D.. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. Palaeontologia Electronica 2001 (4)1. Revisado : 25 de junio 2018 de: <https://www.techworld.com/download/office-business/past-314-3330821/>

33.33 Amat. J. Test estadísticos para variables cualitativas. Test exacto de Fisher, chi-cuadrado de Pearson, McNemar y Q-Cochran. 2016. Revisado : 25 de junio 2018 de: <https://github.com/JoaquinAmatRodrigo/Estadistica-con-R>.

4.2.7 Red interacción proteínas - moléculas pequeñas

Se realizó la red de interacción para el gen GALNS con proteínas asociadas y con moléculas pequeñas. Para lo cual se utilizó el software STITCH 5 (<http://stitch.embl.de/>). (“Search Tool for Interacting Chemicals”).³⁴

La red se realizó 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, utilizado este valor por que representa gráficamente la expresión del fenómeno y no de las exclusiones.

34.34 STITCH 5 (<http://stitch.embl.de/>). (Search Tool for Interacting Chemicals).

5. RESULTADOS

Se incluyeron 16 pacientes con diagnóstico clínico, enzimático y molecular de Síndrome de Morquio A del Suroccidente Colombiano, 9 de ellos (56,2%), pertenecen al género femenino, con rango de edad entre 2 y 58 años.

El total de los pacientes presentaron actividad enzimática de la enzima Galactosamina 6 sulfato sulfatasa alterada con un promedio de 0,04 $\mu\text{mol/l/h}$ donde el valor de referencia de normalidad del laboratorio es $\geq 5,3 \mu\text{mol/l/h}$.

Tabla 2. Niveles enzimáticos de galactosamina 6 sulfato sulfatasa en leucocitos encontrados.

Código	Actividad Enzimática GAGS $\mu\text{mol/l/h}$
1	0,09
2	0,02
3	0,05
4	0,03
5	0,05
6	0,07
7	0,03
8	0,10
9	0,02
10	0,03
11	0,05
12	0,03
13	0,11
14	0,00
15	0,00
16	0,00
MEDIA	0,04 $\mu\text{mol/l/h}$ (0.00 – 5.3)

Variantes detectadas en el gen GALNS de Pacientes con diagnóstico molecular de MPS IVA

Se diagnosticaron molecularmente 16 pacientes con las siguientes variantes:

A. NM_000512.4(GALNS):c.1156C>T (p.Arg386Cys)

En el exon 11, 5 reportes de mutación missense homocigota del gen GALNS c.1156C>T p.R386C y 4 pacientes en forma heterocigota.

Los pacientes homocigotos para R386C se han reportado como fenotipo severo de MPS IVA.¹⁰ Esta variante se encuentra dentro del sitio activo de la enzima N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa.⁶ R386C es la variante GALNS más frecuente que se ha informado sobre el 8,9% de los alelos mutantes.¹⁴

Esta variante fué reportada como causante de enfermedad por Tomatsu et al, en 1992, con dbSNP: rs118204437, perfilada en The European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI) gracias a múltiples observaciones y correlaciones genotípicas.

También en el último reporte en ClinVar en Abril 13 del 2017 fue reportada como patogénica.

B. NM_000512.4(GALNS):c.901G>T (p.Gly301Cys)

Ocho pacientes presentaron la variante missense c.901G>T p.G301C en el exón 9 reportada por Kato Z. et al, 1997. (35) con rs118204443 considerado patogénico en el Clin Var, múltiples observaciones y correlaciones geno-fenotipo según The European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI). Cinco pacientes presentaron la mutación de forma heterocigota. Último reporte en ClinVar como patogénica en Abril 20 del 2016.

- En el exón 9, se reportó en un paciente una mutación nonsense heterocigota c.974G>A p.W325* HGMD CM105265.³⁵
- En el exón 3, una mutación heterocigota c.280C>T p.R94C variante missense reportada por Ogawa et al, 1995. En pub med PMID: 7795586.³⁶
- El exón 13 se encontró en un paciente con una variante c1431G>A heterocigota que resulta en el codón GAG/GAA y en la proteína como una mutación silenciosa pues la expresión de p.E447E, no afectan la estructura, ni el largo de la proteína, por lo cual no se asume como patológica.
- Dos hermanos de género masculino presentaron la forma heterocigota en el Ex09 c.998G>A p.G333D reportada previamente Tapiero et al, Colombia 2016; con un valor de predicción Mutation Taster (<http://www.mutationtaster.org/>) donde se reporta como causante de patología, polyphen PROBABLY DAMAGING with a score of 0.982 (sensitivity: 0.75; specificity: 0.96), SIFT reportada deletérea.³⁷
- Una paciente de género femenino de 2 años de edad, presentó de forma heterocigota una mutación de tipo missense en el exón 5 c.425A>T p.H142L la cual no había sido previamente reportada, esta variante se encuentra en un área nucleótidos y aminoácidos, altamente conservada con diferencias fisicoquímicas moderadas entre los aminoácidos histidina y leucina.

35.35 Wang Z, Zhang W, Wang Y, et al. Mucopolysaccharidosis IVA mutations in Chinese patients: 16 novel mutations. *J Hum Genet.* 2010;55(8):534–540.

36.36 Ogawa T, Tomatsu S, Fukuda S, et al. Mucopolysaccharidosis IVA: screening and identification of mutations of the N-acetyl galactosamine-6-sulfate sulfatase gene. *Hum Mol Genet.* 1995;4:341–349.

37.37 Tapiero-Rodriguez SM, Acosta Guio JC, Porras-Hurtado GL, et al. Determination of genotypic and clinical characteristics of Colombian patients with mucopolysaccharidosis IVA. *The Application of Clinical Genetics.* 2018;11:45-57.

Esta mutación se ingresó al sistema de predicción de proteínas Mutation Taster (<http://www.mutationtaster.org/>) en donde resulta como causante de enfermedad con un 0,999 de probabilidad y en Polyphen2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/>) reporto en el exón 5 c.425A>T p.H142Len, donde se prevé como causante de daño con un score de 1,0, donde un valor cercano a 1 nos indica daño de la proteína, la cual fue publicada por nuestro grupo de trabajo en el Journal of Inborn Errors of Metabolism and Screening:

“Novel mutation on GALNS gene registered in a Morquio Syndrome patient from Colombia” JM Satizabal-Soto, A Sanchez-Gomez, LJ Moreno-Giraldo.,A, Escudero Rodriguez. DOI:10.1177/2326409816653634. Julio 2016.³⁸

Los datos fueron presentados, y el trabajo estuvo nominado al Premio Nacional - Área Ciencias Genómicas en el marco del 51 Congreso Nacional de Ciencias Biológicas Armenia, 18 de Octubre del 2016- Título del trabajo: Caracterización Antropométrica, Metabólica y Molecular de Pacientes con Mucopolisacaridosis Tipo-IVA (Enfermedad Morquio Tipo A) en el Suroccidente Colombiano, y publicado en los resúmenes del evento.³⁹

38. 38 Satizabal-Soto JM, Sanchez-Gomez S, Moreno-Giraldo LA, Escudero Rodriguez A. Novel mutation on GALNS gene registered in a Morquio Syndrome patient from Colombia. Journal of Inborn Errors of Metabolism and Screening: DOI:10.1177/2326409816653634. Julio 2016.

39. 39 Satizabal-Soto JM, Sanchez-Gomez A, Moreno-Giraldo LJ, Escudero Rodriguez A. Caracterización Antropométrica, Metabólica y Molecular de Pacientes con Mucopolisacaridosis Tipo-IVA (Enfermedad Morquio Tipo A) en el Suroccidente Colombiano, Resúmenes 51 Congreso Nacional de Ciencias Biológicas. Área Ciencias Genómicas. Armenia, 18 de Octubre del 2016

Tabla 3. Variantes del gen GALNS encontradas en 16 pacientes por cada nucleótido.

	Variantes	# pacientes con variantes por nucleótido
1	C.1156C>T	9
2	C.1431G>A	1
3	C.692C>G	1
4	C.901G>T	8
5	C.974G>A	1
6	C.280C>T	3
7	C.425 A>T	1
8	C.491 A>C	1
9	C.998G>A	2

El análisis molecular permitió detectar mutaciones en el gen GALNS con lo cual se puede confirmar el diagnóstico de Morquio A, realizar predicciones genotipo-fenotipo, consejería genética y verificación de estado de portadores en los familiares. Los resultados detallados de cada paciente con su frecuencia génica y alélica (Referencia NCBI) se reportan en la Tabla 4.

Las variantes en el gen GALNS encontradas en los 16 pacientes con diagnóstico de MPS IVA del Suroccidente Colombiano se les calculó sus respectivas frecuencias génicas Y alélicas, las cuales se describen en la Tabla 5.

Tabla 4. Variantes en el gen GALNS encontradas en los 16 pacientes con diagnóstico de MPS IVA del Suroccidente Colombiano con sus frecuencias génicas y alélicas. Frecuencias alélicas reportadas por NCBI.

Gen	Cambio de Nucleótido	Frecuencia génica	Frecuencia alélica	Referencia NCBI
GALNS	C.1156C>T	0.56	0.00007	rs118204437
GALNS	C.1431G>A	0.06	0.48292	rs2303271
GALNS	C.692C>G	0.06	0.05164	rs34745339
GALNS	C.901G>T	0.5	0.00011	rs118204443
GALNS	C.974G>A	0.06	0.031	
GALNS	C.280C>T	0.18	0.18	
GALNS	C.425 A>T	0.06	0.031	
GALNS	C.491 A>C	0.06	0.031	
GALNS	C.998G>A	0.125	0.125	

Los resultados exómicos de los 100 pacientes con patologías distintas a MPS IV-A, pertenecientes a la base de Datos del Instituto de Genética Médica – GENOMICS (Cali), se encuentran en la Tabla 5.

Tabla 5. Número total de variantes del gen GALNS encontradas en 100 pacientes con patologías distintas a MPS IV-A, con su respectiva valoración de acuerdo al significado clínico.

Total de variantes encontradas	Significado Clínico	Número de variantes encontradas según su significado clínico
108	Benigno	41
	Patogénico	2
	Efecto Clínico Desconocido	2
	NA	63

En La tabla 6 se describen las características de las variantes del gen GALNS encontradas en pacientes con diagnósticos de patologías diferentes a Morquio A y cálculo de sus frecuencias génicas y alélicas (Referencia NCBI), y en la tabla 7 la correlación entre las variables de pacientes con diagnóstico de MPS IV A y en los 100 pacientes con diagnóstico clínico no sugestivo de MPS IV A

Tabla 6. Variantes en el gen GALNS encontradas en 100 pacientes con diagnóstico de patologías diferentes a Morquio A, del Suroccidente Colombiano con sus respectivas características: posición, cambio de nucleótido, cambio de aminoácido, significado clínico frecuencias génicas, alélicas, referencia NCBI.

Gen	Posición	Cambio de Nucleótido	Cambio de A.A	Significado clínico	Frecuencia génica	Frecuencia alélica	Referencia NCBI
GALNS	16:88884466	C.1431G>A	p.E447E	Benigno	0.61	0.48292	rs2303271
GALNS	16:88902199	C.692C>G	p.A231G	Benigno	0.12	0.05164	rs34745339
GALNS	16:88898507	C.901G>T	p.G301C	Patogénica	0.01	0.00011	rs118204443
GALNS	16:88824853	C.1156C>T	p.R386C	Patogénica	0.01	0.00007	rs118204437
GALNS	16: 88909118	C.240G>A	p.Ser80=	Benigno	0.01	0.00544	rs11865929
GALNS	16: 88902183	C.708C>T	p.His236=	Benigno	0.43	0.27636	rs1064315
GALNS	16: 88908306	C.318C>T	p.Asn106=	Significado incierto	0.04	0.02177	rs34278797
GALNS	16: 88891240	C.1177G>T	p.Ala393Ser	Benigno	0.13	0.06226	rs2303269
GALNS	16: 88901673	C.846C>T	p.Phe282=	Benigno	0.12	0.06169	rs35232749
GALNS	16: 88904086	C.510T>C	p.Tyr170=	Benigno	0.12	0.04558	rs3743544
GALNS	16: 88877983	C.162C>T	p.His54=	Significado incierto	0.02	0.00582	rs145490332
GALNS	16: 88902643	C.599C>T	p. Thr200Met	Benigno	0.04	0.01393	rs7187889
GALNS	16: 88909159	C.199C>A	p. Leu67Met	Benigno	0.07	0.03154	rs11862754
GALNS	16: 88878055	C. 90 G>T	p. Ser 30 =	Benigno	0.01	0.00549	rs8191472
GALNS	16: 88889083	C.1278G>T	p. Gly 426=	Benigno	0.01	0.00348	rs76651187
GALNS	16: 88884459	C.1438G>T	p.Val480Phe	Benigno	0.01	0.00286	rs151296605
GALNS	16: 88884484	C. 1413 C>T	P.Val471=	Benigno	0.01	0.00585	rs73251084

Continuación Tabla 6. Variantes en el gen GALNS encontradas en 100 pacientes con diagnóstico de patologías diferentes a Morquio A, del Suroccidente Colombiano con sus respectivas características: posición, cambio de nucleótido, cambio de aminoácido, significado clínico frecuencias génicas, alélicas, referencia NCBI.

GALNS	16: 88878048	C.97C>T	p.Leu33	Benigno	0.01	0.03530	rs8191473
GALNS	16: 88884521	C.1376C>T	p.Ala459Val	Benigno	0.01	0.01873	rs114703967
GALNS	16:88926089	C>T	p.Asn75Asn	Benigno	0.06	0.02505	rs71395334
GALNS	16: 88926412	C. C>G	p. Leu136Val	Benigno	0.03	0.006231	rs57613275
GALNS	16: 88926432	C. G>A	p.Leu142Leu	Benigno	0.02	0.001252	rs140418381
GALNS	16: 88925989	C. A>G	p.His32Arg	Benigno	0.07	0.04573	rs3784873
GALNS	16: 88926466	C. A>G	p.Asn154Asp	benigno	0.01	0.002024	rs144257072
GALNS	16: 88927314	C. C>T	p.Leu130Phe	NA	0.01	0.0002395	rs187998146
GALNS	16: 88926572	C. C>T	p.Pro189Leu	NA	0.01	0.0001587	rs148834643
GALNS	16: 88926633	C. C>T	p.Ser209Ser	Benigno	0.01	0.0001821	rs151017059
GALNS	16: 88925112	C. A>G	p.Met=	NA	0.01	0.002540	rs114835271
GALNS	16: 88922603	C. G>A	p. Pro76Leu	Benigno	0.02	0.01184	rs79278921
GALNS	16:88923669	C. T>C	p.Ala37Ala	Benigno	0.01	0.04112	rs78088348
GALNS	16: 88927312	C. C>T	p.Ser129Phe	Benigno	0.02	0.01016	rs111674366
GALNS	16: 88880811	C.36G>A		Benigno	0.41	0.25491	rs11076715
GALNS	16: 88880965	C.1483-32G>C		Benigno	0.39	0.21714	rs11076716
GALNS	16: 88902276	C.634-19G>A		Benigno	0.43	0.26430	rs12934499
GALNS	16: 88909095	C.244+19C>T		Benigno	0.14	0.15514	rs35137494
GALNS	16: 88921634	C>G		Benigno	0.48	0.2676	rs34150867
GALNS	16: 88875928	C.*178 A>G		Benigno	0.18	0.20583	rs4695
GALNS	16: 88923377	C. -92T>C		Benigno	0.03	0.05330	rs116702472
GALNS	16: 88878357	C – 50 C>A		Benigno	0.07	0.10325	rs8191469
GALNS	16: 88901579	C.898+42G>C		Benigno	0.11	0.07516	rs76095307
GALNS	16: 88901596	C.898+25C>G		Benigno	0.11	0.08549	rs113936280
GALNS	16: 88902111	C.758+22C>T		Benigno	0.10	0.05170	rs78317153

Continuación Tabla 6. Variantes en el gen GALNS encontradas en 100 pacientes con diagnóstico de patologías diferentes a Morquio A, del Suroccidente Colombiano con sus respectivas características: posición, cambio de nucleótido, cambio de aminoácido, significado clínico frecuencias génicas, alélicas, referencia NCBI.

GALNS	16: 88907516	C. G>A		NA	0.01	0.01	No reportado
GALNS	16: 88909161	C. C>T		NA	0.01	0.01	No reportado
GALNS	16: 88928068	C. A>G		NA	0.01	0.01	No reportado
GALNS	16: 88922698	C. C>A		NA	0.01	0.01	No reportado
GALNS	16: 88923058	C. C>A		NA	0.01	0.01	No reportado
GALNS	16: 88923391	C. C>A		NA	0.09	0.09	No reportado
GALNS	16: 88923068	C. C>A		NA	0.01	0.01	No reportado
GALNS	16: 88926708	C. C >A		NA	0.01	0.01	No reportado
GALNS	16: 88876302	C. C>A		NA	0.01	0.01	No reportado
GALNS	16: 88908418	C. G>A		NA	0.01	0.01	No reportado
GALNS	16: 88923365	C. G>A		NA	0.01	0.01	No reportado
GALNS	16: 88923120	C. T>G		NA	0.01	0.01	No reportado
GALNS	16: 88923667	C. G>A		NA	0.01	0.01	No reportado
GALNS	16: 88877006	C. T>A		NA	0.01	0.01	No reportado
GALNS	16: 88877890	C. G>A		NA	0.01	0.01	No reportado
GALNS	16: 88923105	C. C>A		NA	0.01	0.01	No reportado
GALNS	16: 88923121	C. C>A		NA	0.01	0.01	No reportado
GALNS	16: 88878064	C. C>A		NA	0.01	0.01	No reportado
GALNS	16: 88878181	C. C>A		NA	0.01	0.01	No reportado
GALNS	16: 88909081	C. C>A		NA	0.01	0.01	No reportado
GALNS	16: 88878051	C. C>A		NA	0.01	0.01	No reportado
GALNS	16: 88904019	C. G>A		NA	0.01	0.01	No reportado
GALNS	16: 88893125	C. C>A		NA	0.01	0.01	No reportado
GALNS	16: 88923664	C. T>C		NA	0.01	0.01	No reportado

GALNS	16: 88926388	C. C>T		NA	0.01	0.0943	rs28444630
GALNS	16: 88903999	C. C>T		NA	0.01	0.00005052	rs182345470
GALNS	16: 88909494	C. T>G		NA	0.01	0.0008890	rs111726280
GALNS	16: 88877884	C. C>A		NA	0.01	0.007563	rs74324361
GALNS	16: 88876593	C. G>A		NA	0.01	0.003748	rs8191493
GALNS	16:88901594	C. C>T		NA	0.01	0.002232	rs188790359
GALNS	16: 88922630	C. T>C		NA	0.01	0.01890	rs3784878
GALNS	16: 88922635	C. A>G		NA	0.01	0.01955	rs3784877
GALNS	16: 88891146	C. C>T		NA	0.01	0.001795	rs115524203
GALNS	16: 88876794	C. G>A		NA	0.02	0.02	No reportado
GALNS	16: 88931914	C. T>C		NA	0.06	0.06	No reportado
GALNS	16: 88923120	C. T>G		NA	0.01	0.01	No reportado
GALNS	16: 88904210	C. C>A		NA	0.02	0.02.	No reportado
GALNS	16: 88888955	C. C>A		NA	0.01	0.01	No reportado
GALNS	16: 88909446	C. C>T		NA	0.01	0.01	No reportado
GALNS	16: 88904222	C. C >A		NA	0.01	0.01	No reportado
GALNS	16: 88904220	C. C>A		NA	0.01	0.01	No reportado
GALNS	16:88902277	C.634-20C>T		Benigno	0.22	0.09768	rs17603837
GALNS	16:88904020	C.556+10C>T		Benigno	0.01	0.00482	rs77514811
GALNS	16:88909065	C.244+49C>T		Benigno	0.03	0.00543	rs13334220
GALNS	16:8876103	C.*3A>G		Benigno	0.03	0.01741	rs2070256
GALNS	16:88923353	C.-68C>T		Benigno	0.01	0.1200	rs144789309
GALNS	16:88893288	C.1003-42C>T		Benigno	0.01	0.03542	rs139088253
GALNS	16:88909086	C.T>C		NA	0.01	0.00003	rs202214494
GALNS	16:88891139	C.G>A		NA	0.13	0.06234	rs116993143
GALNS	16:88876596	C.G>A		NA	0.02	0.002111	rs116389635
GALNS	16:88877004	C.A>G		NA	0.03	0.02181	rs8191487
GALNS	16:88893295	C.T>C		NA	0.02	0.002396	rs114113199
GALNS	16:88909445	C.T>C		NA	0.04	0.009087	rs28493584
GALNS	16:88926388	C.C>T		NA	0.07	0.0943	rs28444630
GALNS	16:88889163	C.C>T		NA	0.06	0.008072	rs79025743
GALNS	16:88922915	C.C>A		NA	0.01	0.01	No reportado
GALNS	16:88878189	C.C>A		NA	0.01	0.01	No reportado

GALNS	16:88893095	C.A>T		NA	0.01	0.01	No reportado
GALNS	16:88922845	C.C>A		NA	0.01	0.01	No reportado
GALNS	16:88926725	C.C>A		NA	0.01	0.01	No reportado
GALNS	16:88923059	C.C>A		NA	0.01	0.01	No reportado
GALNS	16:88928119	C.C>A		NA	0.01	0.01	No reportado
GALNS	16:88923505	C.C>A		NA	0.01	0.01	No reportado
GALNS	16:88923110	C.G>A		NA	0.01	0.01	No reportado
GALNS	16:88876305	C.G>A		NA	0.01	0.01	No reportado

Tabla 7. Correlación Variables encontradas del Gen GALNS en 16 pacientes con Diagnóstico de MPS IVA y en 100 pacientes con diagnósticos diferentes a la MPS IVA.

Variante	# pacientes con diagnóstico de MPS IVA con variantes por nucleótido	# pacientes con diagnóstico DIFERENTE de MPS IVA con variantes por nucleótido	Significado Variante
C.1431G>A	1	61	BENIGNA
C.692C>G	1	12	BENIGNA
C.1156C>T	9	1	PATOGÉNICA
C.901G>T	8	1	PATOGÉNICA

Tabla 8. Variantes del gen GALNS encontrada en 16 con pacientes MPS IV A del Suroccidente Colombiano con su respectivo locus, cambio de nucleótido, cambio de A.A, actividad enzimática, resultados de usos de herramientas de predicción de variantes, Significancia Clínica, tipo de mutación.

No	Locus	Cambio de Nucleótido – Ref. Bibliográfica	Cambio de A.A	Actividad enzimática	POLYPHEN 2	MUTATION TASTER	SIFT	ClinVar	Tipo Mutación de
1	Ex11	c.1156C>T (homo) (Ogawa, 1995)	p.R386C	0,3 µmol/l/h	0,999	0,999	Deletérea	Pathogenic/ Likely pathogenic	Missense variant
2	Ex09	c.974G>A (het) (Wang, 2010)	p.W325*	0,7 µmol/l/h	0,999	0,999	Deletérea	NR	Non sense
	Ex03	c.280C>T (het) (Ogawa, 1995)	p.R94C		1,000	0,999	Deletérea	NR	Missense variant
3	Ex11	c.1156C>T (het) (Ogawa, 1995)	p.R386C	0,4 µmol/l/h	0,999	0,999	Deletérea	Pathogenic/ Likely pathogenic	Missense variant
	Ex09	c.901G>T (het) (Bunge, 1997)	p.G301C		0,999	0,999	Deletérea	Pathogenic	Missense variant
4	Ex09	c.901G>T (homo) (Bunge, 1997)	p.G301C	0,3 µmol/l/h	0,999	0,999	Deletérea	Pathogenic	Missense variant
5	Ex11	c.1156C>T (het) (Ogawa, 1995)	p.R386C	0,3 µmol/l/h	0,999	0,999	Deletérea	Pathogenic/ Likely pathogenic	Missense variant
	Ex09	c.901G>T (het) (Bunge, 1997)	p.G301C		0,999	0,999	Deletérea	Pathogenic	Missense variant
6	Ex09	c.901G>T (het) (Bunge, 1997)	p.G301C	0,3 µmol/l/h	0,999	0,999	Deletérea	Pathogenic	Missense variant
	Ex11	c.1156C>T (het) (Ogawa, 1995)	p.R386C		0,999	0,999	Deletérea	Pathogenic/ Likely pathogenic	Missense variant

Continuación Tabla 8. Variantes del gen GALNS encontrada en 16 con pacientes MPS IV A del Suroccidente Colombiano con su respectivo locus, cambio de nucleótido, cambio de A.A, actividad enzimática, resultados de usos de herramientas de predicción de variantes, Significancia Clínica, tipo de mutación.

No	Locus	Cambio de Nucleótido – Ref. Bibliográfica	Cambio de A.A	Actividad enzimática	POLYPHEN 2	MUTATION TASTER	SIFT	ClinVar	Tipo Mutación de
7	Ex09	c.901G>T (het) (Bunge, 1997)	p.G301C	0,3 µmol//h	0,999	0,999	Deletérea	Pathogenic	Missense variant
	Ex11	c.1156C>T (het) (Ogawa, 1995)	p.R386C		0,999	0,999	Deletérea	Pathogenic/ Likely pathogenic	Missense variant
8	Ex11	c.1156C>T (homo) (Ogawa, 1995)	p.R386C	0,5 µmol//h	0,999	0,999	Deletérea	Pathogenic/ Likely pathogenic	Missense variant
9	Ex11	c.1156C>T (homo) (Ogawa, 1995)	p.R386C	0,9 µmol//h	0,999	0,999	Deletérea	Pathogenic/ Likely pathogenic	Missense variant
10	Ex11	c.1156C>T (homo) (Ogawa, 1995)	p.R386C	0,3 µmol//h	0,999	0,999	Deletérea	Pathogenic/ Likely pathogenic	Missense variant
11	Ex11	c.1156C>T (homo) (Ogawa, 1995)	p.R386C	0,3 µmol//h	0,999	0,999	Deletérea	Pathogenic/ Likely pathogenic	Missense variant
12	Ex05	c.425A>T (het) (Satizabal, et al, 2016)	p.H142L	0,3 µmol//h	0,999	0,999	Deletérea	Pathogenic	Missense variant
	Ex09	c.901G>T (het) (Bunge, 1997)	p.G301C		0,999	0,999	Deletérea	Pathogenic	Missense variant

Continuación Tabla 8. Variantes del gen GALNS encontrada en 16 con pacientes MPS IV A del Suroccidente Colombiano con su respectivo locus, cambio de nucleótido, cambio de A.A, actividad enzimática, resultados de usos de herramientas de predicción de variantes, Significancia Clínica, tipo de mutación.

No	Locus	Cambio Nucleótido – Bibliográfica	de Ref.	Cambio de A.A	Actividad enzimática	POLYPHEN 2	MUTATION TASTER	SIFT	ClinVar	Tipo Mutación
13	Ex09	c.901G>T (hom) (Bunge, 1997)		p.G301C	0,11 $\mu\text{mol/l/h}$	0,999	0.999	Deletérea	Pathogenic	Missense variant
14	Ex 05	c.491A>C (het) (Tomatsu,2004		p.A164T	0.0 $\mu\text{mol/l/h}$	0.982	0.999	Deletérea	Pathogenic	Missense variant
	Ex09	c.901G>T (hom) (Bunge, 1997)		p.G301C		0,999	0.999	Deletérea	Pathogenic	Missense variant
15	Ex03	c.280C>T (het) (Ogawa, 1995)		p.R94C	0.0 $\mu\text{mol/l/h}$	1,000	0,999	Deletérea	Pathogenic	Missense variant
	Ex07	c.692C>T (het) (Benign, 2017)		p.A231G		0,629	-	-	Bening	Missense variant
	Ex09	c.998G>A (het) (Tapiero, et al 2016)		p.G333D		0.982	0.999	Deletérea	Pathogenic	Missense variant
	Ex13	c1431G>A(het) (Benign, 2017)		p.E447E		-	-	-	Bening (Año 2017)	-
16	Ex03	c.280C>T (Ogawa, 1995)		p.R94C	0.0 $\mu\text{mol/l/h}$	1,000	0,999			
	Ex09	c.998G>A (het) (Tapiero, et al 2016)		p.G333D		0.982	0.999	Deletérea	Pathogenic	Missense variant

5.2 INTERACCIÓN DE VARIANTE PATOGENICA CON PROTEÍNAS ASOCIADAS

En la red se observan las interacciones entre la proteína GALNS (nodo de color rojo) con algunas proteínas asociadas, y con pequeñas moléculas. Figura 7.

Las líneas verdes indican interacción entre una molécula química y una proteína, líneas rojas indican interacción entre dos moléculas químicas, líneas grises la interacción proteína-proteína.

Es importante tener en cuenta los estudios realizados para las interacciones de proteínas, como aquellos llevados a cabo por Wang et al.⁴⁰ Donde describieron un paciente checo con síndrome de Morquio y deficiencia de adenina fosforribosiltransferasa (APRT)) concluyendo que GALNS y APRT se transcriben en la misma orientación (centromérico a telomérico), y que la deficiencia combinada de APRT / GALNS puede ser más común de lo que se ha observado hasta ahora.

40. 40 Wang, L., Ou, X., Sebesta, I., Vondrak, K., Krijt, J., Elleder, M., Poupetova, H., Ledvinova, J., Zeman, J., Simmonds, H. A., Tischfield, J. A., Sahota, A. Combined adenine phosphoribosyltransferase and N-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase deficiency. *Molec. Genet. Metab.* 68: 78-85, 1999.

Figura 7. Red de Interacción del gen GALNS con otras moléculas – proteínas.



Fuente. ⁴¹ STITCH 5 (<http://stitch.embl.de/>). (Search Tool for Interacting Chemicals).

41. 41 Stitch 5 (<http://stitch.embl.de/>). (Search Tool for Interacting Chemicals).

5.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE FISHER

Frecuencia Génica 100 pacientes con patologías distintas a MPS IV-A vs paciente con MPS IV-A

Test for equal means

	Sum of sqrs	df	Mean square	F	p (same)
Between groups:	0,0231125	1	0,0231125	0,2958	0,6061
Within groups:	0,468775	6	0,0781292		Permutation p (n=99999)
Total:	0,491888	7			0,7157

Ho: No existe diferencia significativa en las frecuencias génicas de pacientes con MPS IV-A y pacientes que no padecen la enfermedad.

Ha: Existe diferencia significativa en las frecuencias génicas de pacientes con MPS IV-A y pacientes que no padecen la enfermedad.

La prueba exacta de Fisher produce un valor p de 0.6061 y F de 0.2958. Puesto que este valor p es mayor que los niveles comunes de significancia (α) establecidos convencionalmente de 0.05, no se permite rechazar la hipótesis nula. Lo anterior indica que, aunque aparentemente por los datos suministrados en este trabajo, podría existir una diferencia entre las frecuencias génicas de los pacientes control y los pacientes con MPS IV-A, estadísticamente se observa que no hay evidencia suficiente que permita indicar que las frecuencias génicas de pacientes con la enfermedad son diferentes de aquellos con diagnóstico de patologías diferentes a Morquio A.

Este resultado permite plantear que en términos de proporción, a pesar de que los pacientes diagnosticados con la enfermedad, tienen valores mucho más robustos de frecuencia génica en sus variantes, indicando la presencia de la patología, estas variantes también encontradas en aquellos que no han sido diagnosticados hasta el momento con la enfermedad, en proporción con el total de pacientes evaluados (100) se distribuye de manera homogénea, sin asociarse con un diagnóstico positivo o no para la enfermedad, explicando de esta manera la

similitud entre variantes presentes en afectados y los no diagnosticados de MPS IVA .

Al hacer una comparación de las frecuencias génicas obtenidas en este trabajo, con las reportadas para Colombia, se encontró que hasta el momento, la información acerca de las frecuencia génicas de ésta enfermedad continua siendo escasa. Trabajos realizados por Barrera et al en el 2009 reportaron la prevalencia de la MPS IV-A en Colombia, sin embargo no precisaron los valores de frecuencias obtenidas, por lo que no es posible tener un referente de frecuencias génicas para el país antes de la realización de este trabajo.

6. DISCUSIÓN

En 16 pacientes diagnosticados enzimática y molecularmente con MPS IV-A del Suroccidente Colombiano, se encontraron 9 variantes para el gen GALNS; estas variantes se registraron en el rango de las más frecuentemente encontradas en toda población mundial. Se obtuvieron 2 variantes benignas (C.1431G>A y C.692C>G) y 7 patogénicas; por su parte, en el grupo de los pacientes sin MPS, se encontraron 108 variantes: 41 benignas, 2 de significado clínico patogénico, 2 VOUS, y 63 no reportado su efecto poblacional, lo cual implica resaltar la importancia de su estudio, clasificación y efecto en la funcionalidad de la proteína y su expresión poblacional.

En contraste con las referencias previas de reporte de variantes del gen GALNS, se encontró que la variante c.1156C>G, p.Arg386Cys, se reporta en 9 de los 16 pacientes lo que equivale a un 56,2%, lo cual está por encima del porcentaje reportado en niños colombianos según reporte en la literatura.⁴³ seguido en frecuencia por las mutaciones C.901G>T y C.280C>T con el 50% y 18% de los alelos cada una.

La variante c.901G>T p.G301C se reporta en la literatura con un 36% de los alelos registrados en pacientes colombianos⁴³ lo cual está por debajo de lo encontrado en el presente trabajo, donde 8 pacientes (50%), presentan ésta variante. No se encontraron pacientes con la variante p.Ile113Phe, lo cual está de acuerdo con la literatura que sugiere una distribución más europea de esta variante.

Tres mutaciones de tipo missense o cambio de sentido se han descrito como las más frecuentes en la población mundial: C.1156C>T (p.R386C), C.901G>T (p.G301C) y c.337A>T (p.I113F), pero debido a la gran heterogeneidad alélica descrita, estas mutaciones corresponden solo al 20% de todos los alelos

analizados; dos de estas mutaciones se encontraron en alta frecuencia en los pacientes con MPS IV-A analizados en este estudio. Trabajos realizados por Kato et al.⁴⁵ en 12 pacientes colombianos con MPS-IV, lograron identificar tres mutaciones de tipo missense p.G301C, p.S162F y p.F69V (4); el 10.5% de la población analizada presentó la mutación p.S162F y el 68,4% de los alelos analizados presentaron la mutación p.G301C. Kato y colaboradores, reportaron esta mutación en su primer estudio molecular de pacientes colombianos, demostrando que afecta severamente la actividad enzimática al alterar el núcleo hidrofóbico y modificar su plegamiento pero no su estructura secundaria.⁴² En nuestro estudio, esta mutación se encontró en el 50% de los pacientes con fenotipo severo y adicionalmente, esta alteración se ha considerado como una mutación fundadora en la población colombiana. Actualmente, también se ha reportado en población marroquí, portuguesa, francesa, brasilera y española, siendo en esta última la más frecuente (20%)³⁸

No se encontraron las variantes p.Thr312Ser, p.Met391Val, p.Ala291Thr, p.Ser287Leu, p.Met318Arg, p.Arg253Trp, lo cual confirma la poca o casi nula distribución de estas variantes en Latinoamérica (45-46). Se encontraron otras variantes que aunque conocidas previamente en la literatura, no se habían reportado en pacientes latinoamericanos tales como c.491A>C (het) p.A164T, c.692C>T (het) p.A231G, c.974G>A (het) p.W325*. Estas 3 variantes se encontraron cada una en un paciente, respectivamente.

Se realizó una revisión bibliográfica de los alelos encontrados, con los reportes de fenotipo previos y se encontró que 14 pacientes presentaban variantes categorizadas como fenotípicamente severas.⁴⁴⁻⁴³

42.42 Kato, Z., Fukuda, S., Tomatsu, S., Vega, H., Yasunaga, T., Yamagishi, A. Kondo, N.. A novel common missense mutation G301C in the N-acetylgalactosamine-6- sulfate sulfatase gene in mucopolysaccharidosis IVA. Human Genetics. 1997; 101(1), 97.

43.43 Lee NH, Cho SY, Maeng SH, et al. Clinical, radiologic, and genetic features of Korean patients with mucopolysaccharidosis IVA. Korean J Pediatr. 2012;55(11):430–437.

La variante C.425 A>T (p.H142L), encontrada en un 6% de los pacientes con MPS IV-A evaluados en este estudio, según estudios realizados por Tapiero et al, ha relacionado con un fenotipo severo de la enfermedad;³⁸ de la misma manera, la variante C.974G>A (p.W325X) con una frecuencia genotípica en este estudio de 6%, se ha relacionado con un fenotipo severo de la enfermedad; según estudios de Tomatsu et al (2006) este cambio da como resultado un dominio defectuoso de arilsulfatasa, causando la pérdida de algunos componentes N-terminales (la última hoja β y las últimas dos α -hélices) y todos los componentes C-terminales (cuatro hojas β y una α -hélice).¹⁸ La mutación c.280C>T (p.R94C) encontrada en nuestro estudio en un 18% de los pacientes afectados con MPS IV-A, fue reportada en dos ocasiones por Cole et al. en 1996, y por Dung et al. en 2013,¹⁹⁻³⁵ coincidiendo en que ésta se asocia con una expresión fenotípica severa de la enfermedad; así mismo, la mutación c.998G>A (p.G333D) recientemente reportada, también se asoció con un fenotipo severo de la enfermedad. Estudios realizados por Pachajoa et al (2016) mostraron que los cambios de aminoácidos encontrados por la presencia de estas mutaciones en la proteína podrían afectar tanto su estructura tridimensional como su funcionamiento; encontrando para ambas mutaciones, efectos negativos en relación con la estabilidad de la proteína, accesibilidad a solventes y polaridad, que los hacen marcadores de riesgo para la aparición de dicha enfermedad.³⁸⁻⁴³ Finalmente, la variante C.491 A>C (p.Asn164Thr) encontrada en este análisis en un 6% de los pacientes analizados, se ha caracterizado por presentar una correlación clínica incierta, puesto que diferentes estudios la han encontrado en pacientes con fenotipo atenuado en el estado heterocigótico compuesto y también en pacientes con fenotipo grave.³⁸ Esta mutación ha sido reportada en la literatura para fenotipos indeterminados⁷⁻⁴⁴ y genera un cambio en la proteína con una interrupción en la superficie evitando la formación adecuada de enlaces de hidrógeno, específicamente en el dominio.⁴⁷

44. 44 Lee NH, Cho SY, Maeng SH, et al. Clinical, radiologic, and genetic features of Korean patients with mucopolysaccharidosis IVA. *Korean J Pediatr.* 2012;55(11):430–437.

Una sola variante reportada en el exón 9 (c.974G>A (het)) de uno de los 16 pacientes con MPS IV-A genera un cambio de triptófano a un codón de parada. Esta variante sin sentido (nonsense) produce una proteína truncada.

En el grupo de los 100 pacientes sin diagnóstico de MPS, se encontraron 108 variantes del gen GALNS, la variante clasificada benigna C.1431G>A fue la más frecuente con un 61% de los alelos, seguido en frecuencia por las mutaciones benignas C>G y C.708C>T con 48% y 43% respectivamente. Para este análisis, la mutación patogénica C.1156C>T que en el caso de los 16 pacientes con MPS V-A se presentó como la más frecuente, en esta población se registró en un (1.0%); de la misma manera la variante patogénica C.901G>T.

Desde el punto de vista genotípico, la mitad de los pacientes (8) fueron homocigotos, y el 50% restante tienen heterocigosidad compuesta.

Se encontraron 4 variantes comunes en las dos poblaciones: 2 benignas (C.1431 G>A y C.692 C>G), y dos patogénicas (C.1156C>T y C.901 G>T).

Por otro lado, en cuanto al análisis estadístico realizado a las frecuencias génicas de los pacientes con MPS IV-A y los pacientes control, se obtuvo que no existe una diferencia significativa entre ambos datos, lo que quiere decir que tanto los pacientes diagnosticados con la enfermedad, como aquellos que no la padecen, poseen en su información exónica variaciones en el gen que codifica para la proteína GALNS, en una proporción similar; la gran mayoría de las mutaciones encontradas en los pacientes con MPS IV-A presentaron un significado clínico patológico, a diferencia de aquellos pacientes control en los que un gran porcentaje de las variantes conocidas eran benignas, sin embargo, en términos estadísticos la proporción de variantes tanto patógenas como benignas son posibles de encontrar en pacientes con o sin la enfermedad.

En cuanto a los resultados obtenidos para la red de interacción entre el gen GALNS y proteínas asociadas, se observaron módulos de interacción entre el gen GALNS y varias proteínas – moléculas. El gen N-acetilgalactosamina-6-sulfato sulfatasa (GALNS), responsable de la mucopolisacaridosis autosómica recesiva IVA (MPSIV-A), se ha asignado al brazo largo del cromosoma 16, subregión 24.3, área donde el gen de adenina fosforribosiltransferasa (APRT) también está localizado.⁴⁵ Estudios realizados por Wang et al.⁴⁹ donde describieron un paciente checo con MPS IV-A y deficiencia de adenina fosforribosiltransferasa (APRT)) concluyeron que GALNS y APRT se transcriben en la misma orientación (centromérico a telomérico), y que la deficiencia combinada de APRT / GALNS puede ser más común de lo que se ha observado hasta ahora,⁴⁶ por lo que se puede encontrar interacción entre ambos. También se encontró una interacción entre el gen GALNS y el gen SPG7; este gen al igual que GALNS se localiza en el cromosoma 16, específicamente en el sitio 16q24.3²² y está implicado en el desarrollo de la paraplejia espástica, un conjunto de desórdenes neurodegenerativos caracterizados por una dificultad insidiosa, progresiva, en ocasiones severa, para la marcha.⁴⁷ El gen SPG7 proporciona instrucciones para producir una proteína llamada paraplejina, un miembro de la familia de proteínas AAA. Esta familia de proteínas desempeña un papel en muchas actividades celulares, incluida la regulación de componentes celulares y proteínas. Ubicada dentro de la membrana interna de los centros de células productoras de energía (mitocondrias), la paraplejina es una de las proteínas que forman un complejo llamado proteasa m-AAA. La proteasa m-AAA es responsable del ensamblaje de

45.45 Fukuda S, Tomatsu S, Masuno M, Ogawa T, Yamagishi A, Maruf Rezvi G et al. Mucopolysaccharidosis IVA: Submicroscopic deletion of 16q24.3 and a novel R386C mutation of n-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase gene in a classical Morquio disease. *Human Mutation*. 1996;7(2):123-134.

46.46 Wang, L., Ou, X., Sebesta, I., Vondrak, K., Krijt, J., Elleder, M., Poupetova, H., Ledvinova, J., Zeman, J., Simmonds, H. A., Tischfield, J. A., Sahota, A. Combined adenine phosphoribosyltransferase and N-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase deficiency. *Molec. Genet. Metab*. 68: 78-85, 1999.

47.47 De Michele, G., De Fusco, M., Cavalcanti, F., Filla, A., Marconi, R., Volpe, G., Monticelli, A., Ballabio, A., Casari, G., Coccozza, S. A new locus for autosomal recessive hereditary spastic paraplegia maps to chromosome 16q24.3. *Am. J. Hum. Genet*. 1998; 63: 135-139

los ribosomas (estructuras celulares que procesan las instrucciones genéticas de la célula para crear proteínas) y la eliminación de proteínas no funcionales en las mitocondrias.⁴⁸

Al tratarse de una enfermedad heredo metabólica multisistémica heterogénea y progresiva, se requiere de un diagnóstico precoz, tratamiento oportuno, seguimiento y rehabilitación continua que mejoren la calidad y expectativa de vida, siendo los profesionales de la salud los encargados de identificar a tiempo estos paciente a través de una adecuada y completa caracterización clínica – genotípica requiriendo un manejo transdisciplinario integral.

El análisis bioinformático es una base para la farmacogenómica y proteómica permitiendo un acercamiento completo al comportamiento de esta enfermedad catalogada dentro de la legislación colombiana como una enfermedad huérfana de alto costo y de especial interés en salud pública.

El conocimiento de las redes de expresión, la carga poblacional y presentación de variantes poblacionales, nos permite evaluar su frecuencia poblacional y posibles impactos.

El análisis molecular, genómico y bioinformático permiten detectar variantes en el gen GALNS, predicciones genotipo-fenotipo, cálculo de frecuencia poblacional, verificación de estado de portadores en los familiares, consejería genética, y pensar en un tratamiento orientado en el paciente, dirigido y personalizado con el fin de reducir el impacto en la morbilidad y mortalidad atribuida.

48. 48 Sanchez-Ferro,E. Espectro mutacional de los genes ATL1, SPAST y SPG7 e influencia de la variación genética mitocondrial en pacientes españoles con paraparesia espática hereditaria. Universidad de Oviedo. 2012;136

7. CONCLUSIONES

La MPS tipo IV-A (Morquio A), es una enfermedad de depósito lisosomal autosómica recesiva, es la MPS más frecuente en Colombia, sin embargo actualmente no se conoce exactamente la prevalencia – carga poblacional de esta patología en nuestro país.

Las mutaciones que causan el síndrome de Morquio A detectadas a lo largo del gen, son numerosas, heterogéneas y en su mayoría de tipo missense, incluso las mutaciones más frecuentemente son relativamente poco comunes; sin embargo, el efecto fundador puede alterar considerablemente las frecuencias de alelos en las poblaciones individuales de gen GALNS.

A pesar de la elevada heterogeneidad molecular de las mutaciones, en la literatura colombiana se han observado algunas asociaciones genotipo-fenotipo en donde la mayoría de las mutaciones puntuales están asociadas con fenotipos atenuados, mientras que mutaciones sin sentido, deleciones grandes y alteraciones del sitio de splicing se encuentran asociadas con fenotipos severos.⁴⁹⁻⁵⁰

El análisis genotípico de estos pacientes es semejante a los reportados en registros a nivel mundial. En nuestro estudio se identificaron 9 variantes en los 16 pacientes, una de las cuales reportadas previamente como patológicas por nuestro grupo de investigación.

49. Pachajoa, H., Ruiz-Botero, F., Hernández-Amariz, M., Eichler, S., Castillo-Giraldo, A. Síndrome de Morquio: nueva mutación del gen GALNS en dos hermanos del sur-occidente colombiano. Análisis clínico, molecular y bioinformático. Revista mexicana de pediatría. 2016; (83) 3; 85-92

50. Tomatsu, S., Montano, A. M., Lopez, P., Trandafirescu, G., Gutierrez, M. A., Oikawa, H. et al. Determinant factors of spectrum of missense variants in mucopolysaccharidosis IVA gene. Mol. Genet. Metab. 2006; 89, 139–149.

Conocer el perfil mutacional del gen GALNS permite un acercamiento a la correlación genotipo/fenotipo, además del conocimiento sobre la existencia de heterocigosis compuesta o solo homocigosis.

Las redes de interacción entre el gen que codifica para la proteína GALNS y sus proteínas asociadas y genes demuestran una fuerte interacción y variedad de rutas metabólicas que pueden modular su expresión, el grado y la actividad específica del gen y su correlación fenotipo - genotipo.

No existe diferencia significativa en las frecuencias génicas de pacientes con MPS IV-A y pacientes que no padecen la enfermedad, lo cual indica que hay un aumento de la presencia de estas variantes a nivel de frecuencia poblacional, lo cual podría ser debido a un efecto fundador, y se esperaría la aparición de nuevos casos en la región, de allí la importancia de su detección temprana y tratamiento oportuno que minimice la morbilidad y mortalidad atribuida a esta patología.

8. PERSPECTIVAS

En nuestro medio existen grandes limitaciones entre la cobertura y acceso a los servicios de salud integral, persisten ciertas barreras administrativas, geográficas, económicas, y de accesos a servicios de atención integral, algunas de estas barreras de atención están relacionadas con la calidad y la baja oferta de servicios, por la falta de centros de referencia diagnóstica y tratamiento transdisciplinario unificado, a pesar de considerarse una enfermedad monogénica, a través de las redes de asociación de moléculas pequeñas, proteínas, se ven como ellas interactúan en la expresión protéica y pueden modular su expresión fenotípica- genotípica y tener una visión más compleja de la importancia de su identificación para el tratamiento, seguimiento, pronóstico y consejería.

Éste estudio proporciona nueva información a través de uso de nuevas herramientas de genómica comparativa, predicción, y cálculo de frecuencias alélicas y génicas entre pacientes con MPS y pacientes con patologías diferentes de MPS IV-A, y plantea otras posibles correlaciones, utilizando herramientas de detección, seguimiento y control para esta enfermedad.

La identificación de estas variantes en la población no diagnosticada de MPS IVA nos orienta a evaluar el posible efecto fundador en nuestra población, la posible expansión del gen en nuestra región y la importancia de detección temprana con el fin de minimizar las consecuencias atribuidas a la patología. Se sugiere ampliar este estudio a otros posibles pacientes afectados de la enfermedad de Morquio A que se pudieran diagnosticar a posteriori. Igualmente, continuar el estudio realizando secuenciación exómica completa a todos los paciente afectados por esta patología a fin de establecer las interrelaciones genómicas entre las variables patológicas presentes en el gen GALNS y otras posibles variantes de otros genes alterados presentes en su exoma.

BIBLIOGRAFÍA

Amat. J. Test estadísticos para variables cualitativas. Test exacto de Fisher, chi-cuadrado de Pearson, McNemar y Q-Cochran. 2016. Revisado : 25 de junio 2018 de: <https://github.com/JoaquinAmatRodrigo/Estadistica-con-R>.

Belloso WH, Redal MA. La farmacogenómica y el camino hacia la medicina personalizada. Med (Buenos Aires) [Internet]. Fundación Revista Medicina (Buenos Aires); [cited 2017 Jan 23];70(3):265–74. Available from: http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0025-76802010000300013&lng=es&nrm=iso&tlng=en

Burkhalter N. Evaluación de la escala Borg de esfuerzo percibido aplicada a la rehabilitación cardiaca. Rev Lat Am Enfermagem. 1996;4(3):65–73.

Caciotti A, Tonin R, Rigoldi M, et al. Optimizing the molecular diagnosis of GALNS: novel methods to define and characterize Morquio-A syndrome-associated mutations. Hum Mutat. 2015;36(3):357–368

Crapo RO, Casaburi R, Coates AL, Enright PL, MacIntyre NR, McKay RT, et al. ATS statement: Guidelines for the six-minute walk test. Am J Respir Crit Care Med. 2002;166(1):111–7.

De Michele, G., De Fusco, M., Cavalcanti, F., Filla, A., Marconi, R., Volpe, G., Monticelli, A., Ballabio, A., Casari, G., Coccozza, S. A new locus for autosomal recessive hereditary spastic paraplegia maps to chromosome 16q24.3. Am. J. Hum. Genet. 1998; 63: 135-139

Díaz JC, Suárez MA, Tomatsu SA. Contribución Colombiana Al Conocimiento Colombian Contribution To Knowledge. Issn. 2012;34(3):221–41.

Dũng VC, Tomatsu S, Montaña AM, Gottesman G, Bober MB, Mackenzie W, et al. Mucopolysaccharidosis IVA: correlation between genotype, phenotype and keratan sulfate levels. Mol Genet Metab [Internet]. Elsevier; 2013 Jan 1 [cited 2016 Feb 11];110(1–2):129–38. Available from: <http://www.mgmjournal.com/article/S1096719213002102/fulltext>

Fukuda S, Tomatsu S, Masuno M, Ogawa T, Yamagishi A, Maruf Rezvi G et al. Mucopolysaccharidosis IVA: Submicroscopic deletion of 16q24.3 and a novel R386C mutation of n-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase gene in a classical Morquio disease. Human Mutation. 1996;7(2):123-134.

Gómez, AM., García-Robles, R., Suárez-Obando, F. Estimación de las frecuencias de las mucopolisacaridosis y análisis de agrupamiento espacial en los departamentos de Cundinamarca y Boyacá. Biomédica, 32(4), 602–9. 2012 <http://doi.org/10.7705/biomedica.v32i4.574>

Gutiérrez-Clavería M, Beroíza W T, Cartagena S. C, Cavides S. I, Céspedes G. J, Gutiérrez-Navas M, et al. Prueba de caminata de seis minutos. Doc Man Procedimientos Ser Chile. 2008;15–24.

Hammer, Ø., Harper, D.A.T & Ryan, P.D.. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. Palaeontologia Electronica 2001 (4)1. Revisado : 25 de junio 2018 de: <https://www.techworld.com/download/office-business/past-314-3330821/>

Harmatz P, Mengel KE, Giugliani R, Valayannopoulos V, Lin SP, Parini R, et al. The Morquio A Clinical Assessment Program: Baseline results illustrating

progressive, multisystemic clinical impairments in Morquio A subjects. *Mol Genet Metab* [Internet]. Elsevier Inc.; 2013;109(1):54–61. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymgme.2013.01.021>

Hendriksz CJ, Berger KI, Giugliani R, Harmatz P, Kampmann C, Mackenzie WG, et al. International guidelines for the management and treatment of Morquio a syndrome. *Am J Med Genet Part A*. 2015;167(1):11–25.

Hendriksz CJ, Harmatz P, Beck M, Jones S, Wood T, Lachman R, et al. Review of clinical presentation and diagnosis of mucopolysaccharidosis IVA. *Mol Genet Metab*. 2013;110(1–2):54–64.

Jones SA, Bialer M, Parini R, Martin K, Wang H, Yang K, et al. Safety and clinical activity of elosulfase alfa in pediatric patients with Morquio A syndrome (mucopolysaccharidosis IVA) less than 5 years. *Pediatr Res* [Internet]. 2015;78(6):10–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/pr.2015.169>

Kato, Z., Fukuda, S., Tomatsu, S., Vega, H., Yasunaga, T., Yamagishi, A., ... Kondo, N. A novel common missense mutation G301C in the N-acetylgalactosamine-6- sulfate sulfatase gene in mucopolysaccharidosis IVA. *Human Genetics*, 101(1), 97–101. 1997 <http://doi.org/10.1007/s004390050594>

Leadley, R. M., Lang, S., Misso, K., Bekkering, T., Ross, J., Akiyama, T. Kleijnen, J. A systematic review of the prevalence of Morquio A syndrome: challenges for study reporting in rare diseases. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 9, 173. 2014 <http://doi.org/10.1186/s13023-014-0173-x>

Lee NH, Cho SY, Maeng SH, et al. Clinical, radiologic, and genetic features of Korean patients with mucopolysaccharidosis IVA. *Korean J Pediatr*. 2012;55(11):430–437.

Morrone A, Caciotti A, Atwood R, Davidson K, Du C, Francis-Lyon P, et al. Morquio a syndrome-associated mutations: A review of alterations in the GALNS gene and a new locus-specific database. *Hum Mutat.* 2014;35(11):1271–9.

Ogawa T, Tomatsu S, Fukuda S, et al. Mucopolysaccharidosis IVA: screening and identification of mutations of the N-acetyl galactosamine-6-sulfate sulfatase gene. *Hum Mol Genet.* 1995;4:341–349.

OMIM [Internet]. Available from: <http://www.omim.org/>

Pachajoa, H., Ruiz-Botero, F., Hernández-Amariz, M., Eichler, S., Castillo-Giraldo, A. Síndrome de Morquio: nueva mutación del gen GALNS en dos hermanos del sur-occidente colombiano. Análisis clínico, molecular y bioinformático. *Revista mexicana de pediatría.* 2016; (83) 3; 85-92

Politei J, Schenone AB, Guelbert N, Fainboim A, Szlago M. Enfermedad de Morquio (mucopolisacaridosis IV-A): aspectos clínicos , diagnósticos y nuevo tratamiento con terapia de reemplazo enzimático. 2015;113(4):359–64.

Rivera-Colón, Y., Schutsky, E. K., Kita, A. Z., & Garman, S.C. The structure of human GALNS reveals the molecular basis for mucopolysaccharidosis IV A. *Journal of Molecular Biology,* 423(5), 736–751. 2012 <http://doi.org/10.1016/j.jmb.2012.08.020>.

Sáenz H, Barrera L. La terapia de reemplazo enzimático en el tratamiento de enfermedades genéticas. *Univ Sci [Internet].* 2003;8:31–42. Available from: <http://revistas.javeriana.edu.co/index.php/scientarium/article/view/4738>

Sanchez-Ferro, E. Espectro mutacional de los genes ATL1, SPAST y SPG7 e influencia de la variación genética mitocondrial en pacientes españoles con

paraparesia espática hereditaria. Universidad de Oviedo. 2012;136

Satizabal-Soto JM, Sanchez-Gomez A, Moreno-Giraldo LJ, Escudero Rodriguez A. Caracterización Antropométrica, Metabólica y Molecular de Pacientes con Mucopolisacaridosis Tipo-IVA (Enfermedad Morquio Tipo A) en el Suroccidente Colombiano, Resúmenes 51 Congreso Nacional de Ciencias Biológicas. Área Ciencias Genómicas. Armenia, 18 de Octubre del 2016

Satizabal-Soto JM, Sanchez-Gomez S, Moreno-Giraldo LA, Escudero Rodriguez A. Novel mutation on GALNS gene registered in a Morquio Syndrome patient from Colombia. Journal of Inborn Errors of Metabolism and Screening: DOI:10.1177/2326409816653634. Julio 2016.

Schweighardt B, Tompkins T, Lau K, Jesaitis L, Qi Y, Musson DG, et al. Immunogenicity of Elosulfase Alfa, an Enzyme Replacement Therapy in Patients With Morquio A Syndrome: Results From MOR-004, a Phase III Trial. Clin Ther [Internet]. Elsevier; 2015 May 1 [cited 2016 Mar 1];37(5):1012–1021.e6. Available from: <http://www.clinicaltherapeutics.com/article/S014929.1814007413/fulltext>

Su JL, Katherine A, Su B, Santos CV, Contreras-garc GA. Caracterización clínica, estudios genéticos, y manejo de la Mucopolisacaridosis tipo IV A. Medicas UIS. 2013;2b(2):34–50

Tapiero-Rodriguez SM, Acosta Guio JC, Porras-Hurtado GL, et al. Determination of genotypic and clinical characteristics of Colombian patients with mucopolysaccharidosis IVA. The Application of Clinical Genetics. 2018;11:45-57.

Tomatsu S, Brusius A, Smith M, Oorii T, Montan AM. Growth Charts for Patients Affected With Morquio A Disease. 2008;1295:1286–95.

Tomatsu S, Dieter T, Schwartz I V., Sarmient P, Giugliani R, Barrera LA, et al. Identification of a common mutation in mucopolysaccharidosis IVA: Correlation

among genotype, phenotype, and keratan sulfate. *J Hum Genet.* 2004;49(9):490–4.

Tomatsu S, Fukuda S, Cooper A, et al. Fourteen novel mucopolysaccharidosis IVA producing mutations in GALNS gene. *Hum Mutat.* 1997;10:368–375.

Tomatsu S, Montan AM, Lopez P, Trandafirescu G. Determinant factors of spectrum of missense variants in mucopolysaccharidosis IVA gene. 2006;89:139–49.

Tomatsu S, Montaña AM, Nishioka T, Gutierrez MA, Peña OM, Tranda Firescu GG, et al. Mutation and polymorphism spectrum of the GALNS gene in mucopolysaccharidosis IVA (Morquio A). *Hum Mutat* [Internet]. 2005 Dec [cited 2016 Feb 27];26(6):500–12. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16287098>

Tomatsu S, Nishioka T, Montaña AM, Gutierrez MA, Pena OS, Orii KO, et al. Mucopolysaccharidosis IVA: identification of mutations and methylation study in GALNS gene. *J Med Genet* [Internet]. 2004;41(7):e98. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1735846&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

Tomatsu, S., Montano, A. M., Lopez, P., Trandafirescu, G., Gutierrez, M. A., Oikawa, H. et al. Determinant factors of spectrum of missense variants in mucopolysaccharidosis IVA gene. *Mol. Genet. Metab.* 2006; 89, 139–149.

Wang Z, Zhang W, Wang Y, et al. Mucopolysaccharidosis IVA mutations in Chinese patients: 16 novel mutations. *J Hum Genet.* 2010;55(8):534–540.

Wang Z, Zhang W, Wang Y, Meng Y, Su L, Shi H, et al. Mucopolysaccharidosis IVA mutations in Chinese patients: 16 novel mutations. J Hum Genet [Internet]. Nature Publishing Group; 2010;55(8):534–40. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20574428>

Wang, L., Ou, X., Sebesta, I., Vondrak, K., Krijt, J., Elleder, M., Poupetova, H., Ledvinova, J., Zeman, J., Simmonds, H. A., Tischfield, J. A., Sahota, A. Combined adenine phosphoribosyltransferase and N-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase deficiency. Molec. Genet. Metab. 68: 78-85, 1999.

Wood TC, Harvey K, Beck M, Burin MG, Chien YH, Church HJ, et al. Diagnosing mucopolysaccharidosis IVA. J Inherit Metab Dis. 2013;36(2):293–307. www.ensambl.org.

Barrera LA. Estudios Bioquímicos de los errores innatos del metabolismo en Colombia, durante dos décadas. Rev Acad Colomb Cienc Exactas Fis Natu. 2009; 33:377-97.

ANEXOS

PUBLICACIONES

De: "Ed McCabe (Molecular Genetics and Metabolism Reports)"
<EvisSupport@elsevier.com>
Fecha: 28 de junio de 2018, 11:20:37 a. m. COT
Para: jose.satizabal@correounivalle.edu.co
Asunto: Your manuscript MGMREPORTS_2018_34_R2 has been accepted
Responder a: lmccabe@mednet.ucla.edu

Ref: MGMREPORTS_2018_34_R2
Title: CLINICAL AND MOLECULAR CHARACTERISTICS OF COLOMBIAN PATIENTS WITH MUCOPOLYSACCHARIDOSIS IVA, AND DESCRIPTION OF A NEW GALNS GENE MUTATION
Journal: Molecular Genetics and Metabolism Reports

Dear Dr. Satizabal Soto,

I am pleased to inform you that your paper has been accepted for publication. Now that your manuscript has been accepted for publication it will proceed to copy-editing and production.

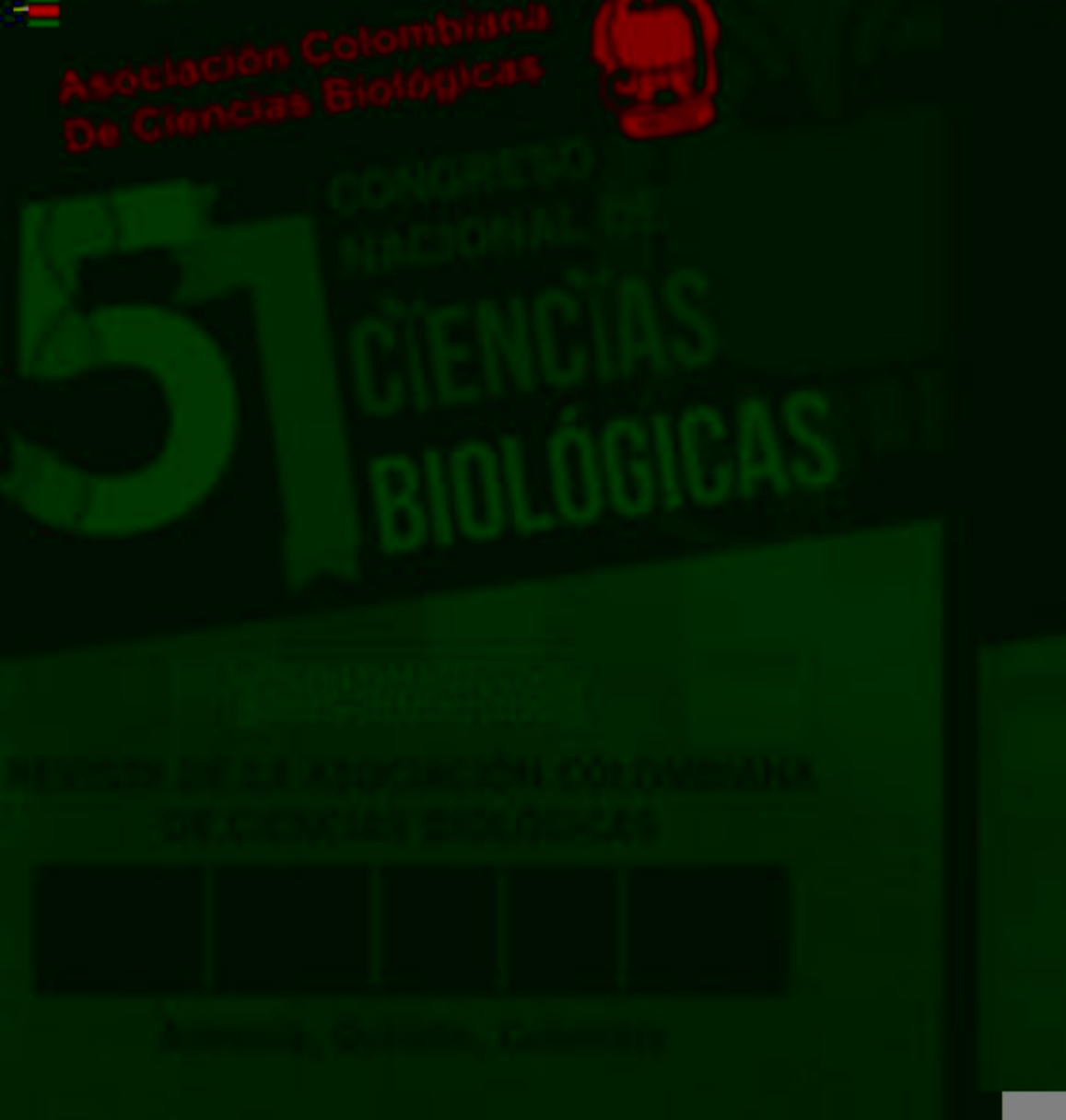
Thank you for submitting your work to Molecular Genetics and Metabolism Reports. We hope you consider us again for future submissions.

Kind regards,

Ed McCabe MD/PhD
Co-Editor
Molecular Genetics and Metabolism Reports



Lina Johanna Moreno Urado, José María...
 ...
 ...



**CARACTERIZACIÓN ANTROPOMÉTRICA, METABÓLICA Y MOLECULAR
DE PACIENTES CON MUCOPOLISACARIDOSIS TIPO-IVA
(ENFERMEDAD MORQUIO TIPO A) EN EL SUROCCIDENTE COLOMBIANO.**

Lina Johanna Moreno Giraldo¹, José María Satizábal Soto², Adalberto Sánchez Gómez²,
Angela María Escudero³.

¹Universidad Santiago De Cali – Genomics. ²Universidad Del Valle – Genomics.

³Estudiante Maestría Ciencias Biomédicas Universidad Del Valle.

INTRODUCCIÓN: El Síndrome de Morquio-A, enfermedad de depósito lisosomal autosómica recesiva debida a deficiencia en la enzima N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa (GALNS) por mutación del gen GALNS cromosoma 16q24.3, ocasionando acumulación de los glucosaminoglicanos (GAGs) condroitin-6-sulfato y queratán sulfato en

92

rev.asoc.col.cienc.biol. - Número 28 suplemento No.1 - Octubre 21 de 2016

los tejidos. En Colombia se desconoce su incidencia y prevalencia. No hay estudios previos de valoración nutricional, insulinoresistencia y moleculares asociado a Mucopolisacaridosis-IV-A.

METODOLOGÍA: Estudio descriptivo, corte transversal, 12 pacientes con diagnóstico clínico-enzimático de Mucopolisacaridosis- IV-A, se determinaron niveles plasmáticos preprandiales de: colesterol total, triglicéridos, LDL-lipoproteína de baja densidad, HDL-lipoproteína de alta densidad, glucosa, insulina basal; se calculó índice de resistencia a la Insulina (HOMA-IR), medidas antropométricas (talla, peso, índice de masa corporal), mutación y análisis genético mediante herramientas bioinformáticas de predicción.

RESULTADOS: 58.3% género femenino. 100% actividad enzimática deficiente. 3 pacientes con sobrepeso y 2 obesidad severa. 100% talla anormal tabla OMS, normal para la edad según tablas Morquio, valores normales de glicemia, insulina, HOMA-IR, 1 paciente hipercolesterolemia leve.

Estudio molecular: 5 mutaciones missense homocigota exon 11 c.1156C>T p.R386C, 1 mutación nonsense heterocigota exon 9 c.974G>A, 1 mutación homocigota missense c.901G>T p.G301C exon 9 y 4 heterocigosis, 1 mutación missense exon 5 c.425A>T p.H142L nueva confirmada como patológica mediante el sistema bioinformático de predicción Mutation Taster y Polyphen2.

CONCLUSIONES: Los pacientes afectados con Síndrome de Morquio-A tienen crecimiento deficitario que incrementa la incidencia de sobrepeso-obesidad y riesgo cardiovascular. El estudio bioinformático mutacional permite realizar investigaciones que aporten al entendimiento de la enfermedad, brindar consejería genética precisa y específica, contribuyendo a los estudios epidemiológicos.

Palabras Claves: Síndrome de Morquio, Glucosaminoglicanos, Valoración Nutricional, Estudio Molecular, Herramientas bioinformáticas.

Journal of **INBORN ERRORS of METABOLISM and SCREENING**

Editor-in-Chief: Roberto Giugliani



**Latin American Society of
Inborn Errors of Metabolism
and Neonatal Screening**

**BONN, GERMANY
JULY 14-17, 2016**

MPS 2016

14th INTERNATIONAL SYMPOSIUM
ON MPS AND RELATED DISEASES

SPECIAL SUPPLEMENT WITH THE ABSTRACTS

Table 1. Molecular Results for the Whole Set of Patients

No	Locus	Nucleotide shift	A.A shift	Literature report	Enzymatic activity	Codon	POLYPHEN 2	MUTATION TASTER
1	Ex11	c.1156C>T (homo)	p.R386C	Ogawa, 1995	0.7 $\mu\text{mol/h}$	CGT, TGT	0.999	0.999
2	Ex09	c.974G>A (het)	p.V423S	Wang, 2010		Stop Codon	0.999	0.999
	Ex03	c.280C>T (het)	p.R94C	Ogawa, 1995	0.4 $\mu\text{mol/h}$	TCT TCC	1.000	0.999
3	Ex11	c.1156C>T (het)	p.R386C	Ogawa, 1995		CGT, TGT	0.999	0.999
	Ex09	c.901G>T (het)	p.G301C	Bunge, 1997	0.3 $\mu\text{mol/h}$	GCG TGC	0.999	0.999
4	Ex09	c.901G>T (homo)	p.G301C	Bunge, 1997	0.3 $\mu\text{mol/h}$	GCG TGC	0.999	0.999
5	Ex11	c.1156C>T (het)	p.R386C	Ogawa, 1995		CGT, TGT	0.999	0.999
	Ex09	c.901G>T (het)	p.G301C	Bunge, 1997	0.3 $\mu\text{mol/h}$	GCG TGC	0.999	0.999
6	Ex09	c.901G>T (het)	p.G301C	Bunge, 1997		CGT, TGT	0.999	0.999
	Ex11	c.1156C>T (het)	p.R386C	Ogawa, 1995	0.3 $\mu\text{mol/h}$	GCG TGC	0.999	0.999
7	Ex09	c.901G>T (het)	p.G301C	Bunge, 1997		CGT, TGT	0.999	0.999
	Ex11	c.1156C>T (het)	p.R386C	Ogawa, 1995	0.5 $\mu\text{mol/h}$	CGT, TGT	0.999	0.999
8	Ex11	c.1156C>T (homo)	p.R386C	Ogawa, 1995	0.9 $\mu\text{mol/h}$	CGT, TGT	0.999	0.999
9	Ex11	c.1156C>T (homo)	p.R386C	Ogawa, 1995	0.3 $\mu\text{mol/h}$	CGT, TGT	0.999	0.999
10	Ex11	c.1156C>T (homo)	p.R386C	Ogawa, 1995	0.3 $\mu\text{mol/h}$	GCA GCT	0.999	0.999
11	Ex11	c.1156C>T (homo)	p.R386C	Ogawa, 1995	0.3 $\mu\text{mol/h}$	GCG TGC	0.999	0.999
12	Ex05	c.425A>T (het)	p.H142L	N/A				
	Ex09	c.901G>T (het)	p.G301C	Bunge, 1997				

patient populations can be distinguished, based on the presence or absence of CNS involvement. The aim of this study is to use an integrated approach to study the relation between the IDS genotype and the central nervous system (CNS) phenotype in the Dutch MPS II population. **Methodology:** The patients' phenotype was determined by two physicians who evaluated the level of education, behaviour and available IQ data. Urine glycosaminoglycan (uGAG) levels were measured by a novel mass spectrometry method specific for heparin and dermatan sulfate. Effects of IDS variants on enzyme activity and intracellular processing were determined. The IDS cDNA was cloned into an expression vector, IDS variants were introduced by site directed mutagenesis, and constructs were transfected into HEK293 cells. Analysis included enzyme activity and immunoblot assays. **Results:** Intellectual disability was severe in 9 patients, intermediate in 1, mild in 1 and absent in 6. Regardless of the level of intellectual disability, the uGAG levels were elevated to similar extents and showed a strong age-dependency. We identified 15 unique IDS variants in 17 patients. All variant cDNA constructs showed strong impairment of IDS protein expression or processing and they all show similarly reduced IDS enzymatic activities. **Conclusion:** The pathogenic effect of IDS variants *in vitro* and the uGAG levels do not correlate with the severity of CNS involvement in MPS II patients. We speculate that the CNS phenotype of MPS II may be explained by the genotype in combination with modifying factors.

Molecular Characterization on Mucopolysaccharidosis Type IV-A Patients at—Cali, Colombia

A. Sánchez Gómez¹, J. Satizábal Soto¹, A. Escudero Rodríguez¹, L. Moreno Giraldo¹

¹Genomics, Cali

Introduction: Morquio syndrome (MPS IVA Mucopolysaccharidosis type IV-A) is a lysosomal storage disease autosomal recessive, with a low prevalence in the general population. The down-regulated expression of the GALNS gene encoding Galactosamine 6-sulfatase involved in the catabolism of two glycosaminoglycans (GAGs): chondroitin-6-sulfate (C6 S) and sulfate keratan (KS) in chondrocytes, is responsible for the onset of clinical manifestations of the disease, in which the most obvious affect the osteoarticular system with appearance of stunting and skeletal dysplasia or dysostosis multiplex. The molecular analysis is performed as an additional confirmation that the different mutations of the affected gene are described, studies in different ethnic population groups have revealed more than 185 different mutations of the gene GALNS. This extensive allelic heterogeneity of mutations of the gene involved is consistent with the broad spectrum of clinical phenotypes observed in patients suffering from MPS IVA. **Methodology:** Whole blood samples were taken from 12 patients, with a positive enzymatic test for MPS IV-A, on whatman paper. DNA was isolated and GALNS gene was sequenced by next-generation sequencing methodology. mutations present were determined and bioinformatic studies for finding referential background in databases The National Center for Biotechnology (NCBI) and ClinVar, The European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI) tool were performed. Genomic analysis was performed with several Software tools to predict the impact of amino acid substitutions: SIFT, Polyphen2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/>), and Mutation Taster (<http://www.mutationtaster.org/>). **Results:** 12 patients were included in this study, 58.3% (7 patients) were female and 41.7% (5 patients) were male. Age ranged between 2 and 28 years. All patients had deficient enzyme activity. In the molecular study of the gene GALNS 5 homozygous missense mutation reports were obtained in exon 11 c.1156C>T p.R386 previously reported to cause disease by Ogawa, 1995, rs118204437, profiled in The European Bioinformatics Inst

(EMBL-EBI). This mutation was also found in a heterozygote complement in 4 patients. One patient was found with a heterozygous nonsense mutation in exon 9 c.974G> A p.W325* (HGMD CM105265, reported by Wang in 20107 and mutation of exon 3 c.280C> T missense variant p.R94C reported by Ogawa, 1995. Only one patient had missense mutation homozygous c.901G> T in exon 9 p.G301C reported by Bunge, 1997 (rs118204443 considered pathogenic in the 1000 genomes project, multiple observations and genotype-phenotype correlations as EMBL-EBI). Four patients had this mutation in heterozygosity. A female patient 2 years old, presented heterozygous missense mutation type in exon 5 c.425A> T p.H142L, which has not been previously reported, which entered into the system the prediction of protein Mutation Taster (<http://www.mutationtaster.org/>) shown to cause disease with a probability of 0.999. In Polyphen2 it is predicted to cause disease with a score of 1.000.

Conclusions: The diagnostic algorithm of MPS IV-A established by the working groups in Prague (2011) and San Diego (2012) includes molecular diagnostics. Bioinformatic study of the reported mutations offers the opportunity to conduct research that contribute to the understanding of the disease, as in the case of mutation not described to date in exon 5 in one patient, in which the use of tools predictive defined the pathogenicity of the mutation allowing more accurate and specific genetic counseling, contributing to epidemiological studies.

Novel Mutation on GALNS Gene Registered in a Morquio Syndrome Patient from Colombia

J. Satizábal Soto¹, A. Sánchez Gómez¹, A. Escudero Rodríguez¹, L. Moreno Giraldo¹

¹Genomics, Cali

Introduction: Morquio syndrome-A (MPS-IV-A OMIM # 253000) is a lysosomal storage disorder that is inherited in an autosomal recessive manner with a very low prevalence. It is characterized by a deficiency of the enzyme N-acetylgalactosamine-6-sulfatase (GALNS), resulting in an accumulation of chondroitin-6-sulfate (C6 S) and keratan (KS) sulfate in many tissues and organs. The most common clinical findings are related to systemic skeletal dysplasia, dwarfism with short trunk, kyphoscoliosis, platyspondilia, instability atlanto-axoid, genu valgus, chest keel, and other alterations such as dental anomalies, ligamentous laxity, corneal opacity, coarse facies, loss hearing, valvular heart disease, respiratory disease. Unlike other MPS, Morquio Syndrome does not exhibit central nervous system involvement, and intelligence ranges on normal indexes. Molecular analysis of DNA is the gold standard to confirm clinical results of abnormal enzyme activity. Besides, it facilitates genetic counseling of the family and establishment for the clinical prognosis. The characterization of these patients through molecular diagnostics allows learn more about native mutations, possible genotypic and phenotypic expression.

Methodology: DNA from a female patient, at preschool education level from urban area of the municipality of Buga-Valle del Cauca-Colombia, was molecularly analyzed. The patient has consanguineous parents and she was diagnosed at 2 months from birth with a bilateral hip dysplasia with a radiological follow-up at 2 years. Persistent signs of dysplasia and disostosis lead to a suspicion of a lysosomal storage disease (mucopolysaccharidosis). Physical examination registered: genu puffy face, chest carination protrusion of the rib cage, umbilical hernia and bilateral valgus. DNA was isolated and sequenced by gene GALNS next-generation sequencing.

Results: Patient with phenotypic osteo-muscular alterations confirmed by radiological images that reported signs of disostosis. Measurement of the enzymatic activity showed a value of 0.06 nmol GALNS / mg prot / h (2-35.9 nmol / mg prot / h, normal range) compatible with Morquio disease. Radiographs of full column were analyzed showing hypoplastic vertebral bodies of C3-C4, C5-C6, L2-L3, T10-T11-T12, L4, and bilateral hip dysplasia. The molecular analysis of gene GALNS reported a heterozygous mutation in exon 9 (c.901G> T p. Gly301Cys), (rs118204443), previously described as causing disease by Bunge in 1997 (92 HGMD Professional 2014.2 PMID 9298823). In addition, a novel mutation was found in exon 5 (c.425A> T p.His142Leu) located in an area of high conservation of nucleotide and amino acid with moderate physicochemical differences between the amino acid Leucine and Histidine. Software bioinformatic analysis with predicting impact of amino acid substitutions was performed. Polyphen2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/>) reported exon 5 c.425A> T p.H142L to cause damage with a score 1.000, and Mutation Taster (<http://www.mutationtaster.org/>) predicted as a disease causing effect with a 0.999 probability this GALNS gene mutation not previously reported in the international databases. **Conclusions:** Mutations causing Morquio-A disease on GALNS gene are numerous, heterogeneous, and most are missense mutations. We reported a novel mutation on exon 5 for screened gene. Bioinformatic software was helpful to predict pathogenic effect on this mutation. Detection of a new mutation contributes to the International Morquio Syndrome Registry, the Census being conducted by national Health government agencies of Colombia on Orphan Diseases. This result would help to build a system of indigenous information to provide more knowledge about the disease, which directly benefits patients in the diagnosis, personalized treatment monitoring.

Expanding the Genotypic Spectrum of Mucopolipidosis II and III Alpha/Beta in Brazil

I. Schwartz¹, F. Sperb-Ludwig², R. Voltolini³, A. Acosta E. Ribeiro⁵, C. Kim⁶, D. Horowitz⁷, R. Boy⁸, S. Phol³, N. Luvwig¹

¹Hospital de Clínicas de Porto Alegre

²Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre