



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Estudios Superiores Zaragoza

Instituto Nacional de Medicina Genómica

Prevalencia y ancestría de la mutación c.1987delC en el gen alfa glucosidasa ácida (*GAA*) causante de la Enfermedad de Pompe en individuos de tres comunidades indígenas en una zona Huasteca de México

Tesis de Licenciatura

Que para obtener el título de:  
Biólogo

Presenta:  
Adriana Luz María Grijalva Pérez

Director de tesis:  
Alessandra Carnevale Cantoni

Asesor interno:  
José Misael Vicente Hernández Vázquez



Ciudad de México, 2016



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AVENIDA DE  
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

"ZARAGOZA"

DIRECCIÓN

**JEFE DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR  
P R E S E N T E.**

Comunico a usted que la alumna **GRIJALVA PÉREZ ADRIANA LUZ MARÍA**, con número de cuenta **308264807**, de la carrera de Biología, se le ha fijado el día **16 de noviembre de 2016** a las **10:00 hrs.**, para presentar examen profesional, el cual tendrá lugar en esta Facultad con el siguiente jurado:

**PRESIDENTE** M. en C. CARLOS BAUTISTA REYES

**VOCAL** Dra. ALESSANDRA CARNEVALE CANTONI\*

**SECRETARIO** M. en C. JOSÉ MISAEL VICENTE HERNÁNDEZ VÁZQUEZ

**SUPLENTE** Dr. MARIO AGUSTÍN ALTAMIRANO LOZANO

**SUPLENTE** Dra. LUCILA ÁLVAREZ BARRERA

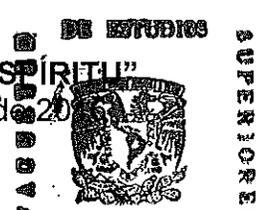
El título de la tesis que presenta es: **Prevalencia y ancestría de la mutación c.1987delC en el gen alfa glucosidasa ácida (GAA) causante de la Enfermedad de Pompe en individuos de tres comunidades indígenas en una zona Huasteca de México.**

Opción de titulación: Tesis.

Agradeceré por anticipado su aceptación y hago propia la ocasión para saludarle.

**ATENTAMENTE** DE ESTUDIOS SUPERIORES  
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"  
México, D. F., a 18 de octubre de 2016

**DR. VÍCTOR MANUEL MENDOZA NÚÑEZ**  
DIRECCIÓN



RECIBÍ  
OFICINA DE EXÁMENES  
PROFESIONALES Y DE GRADO

VO. BO.  
M. en C. ARMANDO CERVANTES SANDOVAL  
JEFE DE CARRERA

El presente trabajo se realizó bajo la dirección de la Dra. Alessandra Carnevale Canotoni,  
en el laboratorio de Enfermedades Mendelianas y el departamento de Genómica  
Computacional del Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN)

# Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México.

A la Facultas de Estudios Superiores Zaragoza.

Al Institutito Nacional de Medicina Genómica.

A la biología.

A la Doctora Alessandra Carnevale Cantoni por haberme permitido formar parte de su grupo de trabajo, gracias por la confianza y los consejos.

A la Doctora Sandra Rosas Madrigal por su asesoría constante y las atenciones brindadas a mi formación.

A esas personitas tan importantes en mi vida, que más que amigas son hermanas. Gracias Miriam, Mireya y Marlene por llenar mis días de alegría, por tanto cariño.

A mis amigos Juanito y Kike por apoyarme en todo momento.

A esa persona que me motiva a ser mejor día con día, gracias por compartir tus sueños conmigo, por tu amor, apoyo y confianza. Gracias por las canciones que se quedan en el corazón, por tus canciones que me llenan de vida.

A mis hermanos Leticia, Jesús y Janet por su apoyo y consejos.

A mis padres: Ceferina Pérez Hernández y Juan Manuel Grijalva, a quienes sin su gran esfuerzo nada de esto hubiera sido posible. Mamá, gracias por tu apoyo incondicional, por tantos desvelos para hacer de mí una persona de bien, gracias por tanto amor. A ti papá, gracias por cuidarme, gracias por tu infinito amor. Aunque ya no estés aquí vivirás siempre en mi corazón.

## ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	1
1. RESUMEN.....	2
2. INTRODUCCIÓN .....	3
2.1 Enfermedades por depósito lisosomal .....	3
2.2 Enfermedad de Pompe.....	3
2.3 Patología.....	4
2.4 Antecedentes .....	6
2.5 Manifestaciones Clínicas.....	6
2.5.1 Enfermedad de Pompe Clásica.....	7
2.5.2 Enfermedad de Pompe Tardía.....	8
• Forma Juvenil.....	8
• Forma Adulta .....	9
2.6 Tratamiento .....	9
2.7 Gen alfa glucosidasa ácida.....	9
2.8 Proteína alfa glucosidasa ácida.....	10
2.9 Mutaciones en el gen GAA.....	11
2.10 Epidemiología .....	12
2.11 Antecedentes directos.....	13
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	15
4. JUSTIFICACIÓN .....	17
5. HIPOTESIS.....	18
6. OBJETIVOS.....	18
6.1 Objetivos generales.....	18
6.2 Objetivos particulares.....	18
7. MATERIAL Y MÉTODO .....	18
7.1 Muestreo .....	19
7.1.1 Descripción del área de estudio.....	19
• Papatlaco.....	19
• Emiliano Zapata .....	19
• Tetlalpan.....	19
7.1.2 Población de estudio .....	20

• Criterios de inclusión .....	20
• Criterios de exclusión.....	20
7.1.3 Fase preliminar .....	20
7.1.4 Toma de muestra .....	21
7.2 Prevalencia.....	21
7.2.1 Procesamiento de las muestras .....	21
• Extracción de ADN.....	21
• Integridad de ADN.....	22
7.2.2 Genotipificación .....	22
• Curvas de fusión de alta resolución (High Resolution Melt).....	22
Q-PCR.....	24
Análisis de las curvas de fusión.....	24
7.2.3 Validación de resultados .....	24
PCR.....	25
Purificación de los productos de la PCR.....	25
Secuenciación.....	26
7.3 Origen ancestral .....	27
7.3.1 Procesamiento de las muestras.....	27
7.3.2 Ancestría global.....	28
7.3.3 Ancestría local .....	29
8. RESULTADOS.....	29
8.1 Prevalencia .....	29
8.2 Origen ancestral .....	32
8.2.1 Ancestría global.....	32
8.2.2 Ancestría local.....	40
9. ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	42
10. CONCLUSIONES .....	45
11. REFERENCIAS .....	46

## ABREVIATURAS

<b>ADN</b>	Acido desoxirribonucleico
<b>CEU</b>	Residentes de Utah con ascendencia del norte y oeste de Europa
<b>ddNTP</b>	Dideoxynucleótido
<b>dNTP</b>	Dinucleótidos
<b>EDL</b>	Enfermedades por deposito lisosomal
<b>EP</b>	Enfermedad de Pompe
<b>EPC</b>	Enfermedad de Pompe Clásica
<b>EPT</b>	Enfermedad de Pompe Tardía
<b>G1P</b>	Glucosa 1 fosfato
<b>G6P</b>	Glucosa 6 fosfato
<b>GAA</b>	Alfa glucosidasa ácida
<b>NAT</b>	Nativo americano
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>Q-PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
<b>SNP</b>	Polimorfismo de un solo nucleótido
<b>TRE</b>	Terapia de remplazo hormonal
<b>UDP</b>	Uridina difosfato
<b>YRI</b>	Yoruba

## 1. RESUMEN

La Enfermedad de Pompe (EP) (OMIM 232300) es un trastorno neuromuscular raro, progresivo y letal (Schultz *et al.*, 2011), caracterizado por un cuadro clínico severo que se traduce en debilidad proximal de extremidades, cardiomiopatía, insuficiencia ventilatoria importante y afección del músculo liso, lo cual provoca manifestaciones gastrointestinales (Hirschhorn *et al.*, 2001).

Se trata de una enfermedad autosómica recesiva que ocurre por una mutación en el gen alfa glucosidasa ácida (GAA), el cual codifica para la enzima  $\alpha$ -1,4 glucosidasa ácida que se encarga de catalizar la hidrólisis de los enlaces  $\alpha$ -1,4 y  $\alpha$ -1,6 del glucógeno intralisosomal, dejándolo disponible en forma de glucosa (Hirschhorn *et al.*, 2001). Los individuos afectados no pueden degradar el glucógeno intralisosomal por lo que éste se acumula en múltiples células y tejidos, viéndose principalmente afectados el músculo esquelético, el músculo cardíaco y la musculatura respiratoria (Van der Ploeg *et al.*, 2008).

La EP presenta una frecuencia muy baja, reportándose a nivel mundial un caso por cada 40,000 personas (Ausems *et al.*, 1999). La prevalencia exacta de la EP en la población general es desconocida, y la frecuencia estimada varía entre las diferentes formas clínicas y grupos étnicos (Raben *et al.*, 2002). Para México no existen datos epidemiológicos que permitan conocer su frecuencia, ya que únicamente se mencionan unos 100 casos sospechados o diagnosticados por autopsia.

Este estudio consistió en determinar la prevalencia y origen ancestral de una nueva mutación causante de EP en tres comunidades de la Huasteca del país, donde recientemente se reportaron tres casos de la variante infantil de la enfermedad. Los resultados de la genotipificación muestran una alta prevalencia de portadores de la mutación para la zona de estudio y proporcionan las bases epidemiológicas para justificar un programa preventivo por parte de la Secretaría de Salud de los Estados implicados. El análisis de ancestría mostró en los individuos estudiados aproximadamente un 95% de componente ancestral nativo americano representado por más del 50% del componente ancestral maya. En el cromosoma 17 se identificó una alta proporción de un componente ancestral nativo proveniente del sureste del país (maya-zapoteco), mientras para la mutación se identificó un segmento de componente ancestral maya.

## 2. INTRODUCCIÓN

### 2.1 Enfermedades por depósito lisosomal

Las enfermedades por depósito lisosomal (EDL) son un grupo de errores innatos del metabolismo, caracterizados por el almacenamiento intralisosomal de múltiples moléculas que causan un déficit enzimático en particular (Vellodi, 2004). Ocurren por la deficiencia de una hidrolasa, de una proteína activadora de la enzima o de un transportador de la membrana lisosomal, que facilitan la salida de pequeñas moléculas hacia el exterior del organelo (Futerman *et al.*, 2004).

Las EDL son un grupo heterogéneo de enfermedades monogénicas, de herencia predominantemente autosómica recesiva (Staretz *et al.*, 2009); se caracterizan por la excreción de sustancias por la orina y la acumulación de compuestos no degradados en diferentes órganos y tejidos lo que ocasiona su disfunción (Schultz *et al.*, 2011).

Las EDL engloban a más de 50 trastornos diferentes, cuyos síntomas dentro de estos mismos varían ampliamente, pudiendo causar desde problemas relativamente menores hasta problemas de salud muy graves. Por su gran severidad e importancia histórica, la Enfermedad de Pompe representa uno de los trastornos más reconocidos dentro de este grupo.

### 2.2 Enfermedad de Pompe

La Enfermedad de Pompe (EP), también conocida como enfermedad por almacenamiento de glucógeno tipo II (GSDII OMIM 232300) o déficit de maltasa ácida, es un trastorno neuromuscular raro, progresivo, de curso rápido, que causa debilidad y frecuentemente culmina en la muerte (Schultz, *et al.*, 2011). Se caracteriza por la acumulación de glucógeno intralisosomal en múltiples células y tejidos, viéndose principalmente afectados el músculo esquelético, el músculo cardíaco y la musculatura respiratoria (Van der Ploeg, *et al.*, 2008).

La Enfermedad de Pompe es una enfermedad de naturaleza autosómica recesiva que ocurre por una mutación en el gen de la alfa glucosidasa ácida (GAA), el cual codifica para la enzima  $\alpha$ -1,4 glucosidasa ácida también conocida como maltasa ácida, que se encarga de catalizar la hidrólisis de los enlaces  $\alpha$ -1,4 y  $\alpha$ -1,6 del glucógeno dejándolo disponible en forma de glucosa (Hirschhorn, *et al.*, 2001), así como de hidrolizar la maltosa y otros los oligosacáridos lineales (Moreland *et al.*, 2005).

## 2.3 Patología

La lesión primaria de la Enfermedad de Pompe resulta de la acumulación progresiva de glucógeno intralisosomal en múltiples células del cuerpo, causando interferencia en el proceso normal de autofagia (Raben *et al.*, 2007). Los tejidos principalmente afectados son el músculo esquelético, el músculo cardíaco y la musculatura respiratoria (Van der Ploeg, *et al.*, 2008), traducándose clínicamente como debilidad proximal en extremidades, cardiomiopatía, insuficiencia ventilatoria importante y afección del músculo liso, lo que provoca manifestaciones gastrointestinales (Hirschhorn, *et al.*, 2001).

A nivel celular en el citoplasma, mediante un proceso conocido como glucogenogénesis, la glucosa es convertida a glucógeno, un polímero de almacenamiento de glucosa donde las unidades de glucosa están ensambladas por dos tipos de enlaces, linealmente por enlaces glucosídicos ( $\alpha$ 1-4) y lateralmente por enlaces glicosídicos ( $\alpha$ 1-6) que forman ramificaciones (Fig. 1). Las enzimas involucradas en esta ruta metabólica son la UDP (uridina difosfato) glucosa pirofosforilasa, la glucógeno sintasa y la enzima ramificadora del glucógeno. El glucógeno recién sintetizado es almacenado en gránulos citoplasmáticos de 100 a 400 Å de diámetro, que contienen hasta 120,000 unidades de glucosa. Cuando la energía es necesaria, el glucógeno es degradado nuevamente a glucosa mediante un proceso llamado glucogenolisis, que es modulado por la intervención de tres enzimas: la glucógeno fosforilasa, que cataliza la fosforólisis de los enlaces  $\alpha$  1-4 del glucógeno, produciendo G1P y moléculas con enlaces  $\alpha$  1-6; la enzima desramificadora de glucógeno, que elimina las ramificaciones de glucógeno mediante la catálisis de los enlaces  $\alpha$  1-6, lo que permite completar la acción de la glucógeno fosforilasa; y la enzima fosfoglucomutasa, que transforma la G1P a G6P (Voet, *et al.*, 2006). Adicionalmente existen otras enzimas implicadas en la degradación del glucógeno, sin embargo, lo hacen a menor medida. Tal es el caso de la  $\alpha$ -1,4 glucosidasa ácida, enzima encargada del metabolismo del glucógeno almacenado en los lisosomas, que resulta del proceso natural de reciclaje que emplea la célula conocido como autofagia. La  $\alpha$ -1,4 glucosidasa ácida al igual que las enzimas implicadas en la glucogenolisis en el citoplasma cataliza la hidrólisis de los enlaces glucosídicos  $\alpha$ -1,4 y  $\alpha$ -1,6 del glucógeno (Sugawara, *et al.*, 2009), siendo de gran importancia al ser la única enzima implicada en el metabolismo del glucógeno dentro del lisosoma.

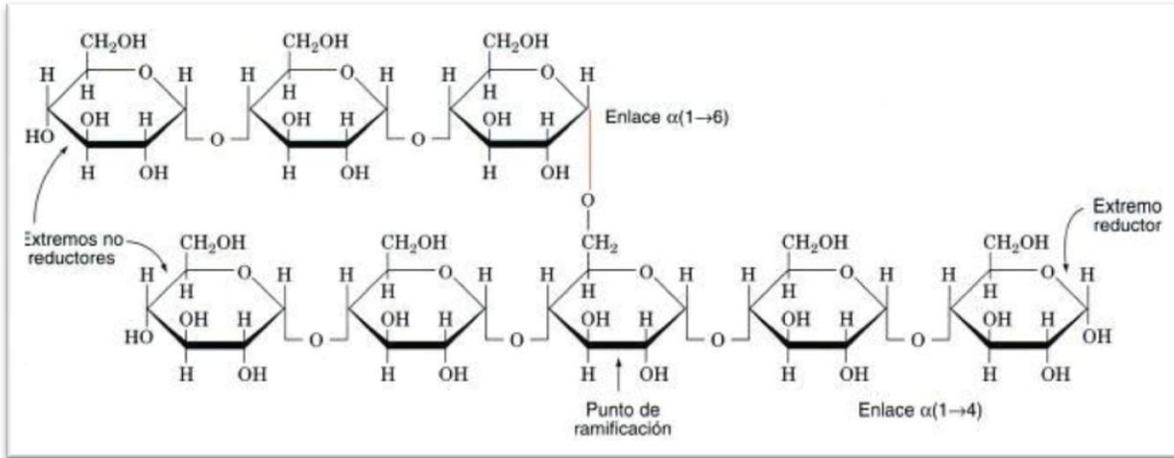


Figura 1. Estructura del glucógeno. Moléculas de glucosa unidas linealmente por enlaces glucosídicos ( $\alpha$ 1-4) y lateralmente por enlaces glicosídicos ( $\alpha$ 1-6) (Referencia: Voet *et al.*, 2003).

Cuando la alfa glucosidasa ácida es deficiente, el glucógeno lisosomal no es degradado y se acumula, causando la afección de éstas célula. La afección se da principalmente en células musculares y del hígado debido al mayor requerimiento energético de estos tejidos. La función que desempeña el glucógeno en estos tejidos es totalmente diferente. El glucógeno muscular funciona como fuente de reserva para la síntesis de ATP necesaria para la contracción muscular, mientras que el glucógeno hepático funciona como reserva de glucosa para el mantenimiento de glucosa en sangre. El glucógeno presente en el hígado constituye cerca del 10% de su peso húmedo, mientras que el glucógeno presente en musculo constituye solo del 1 al 2% de su peso húmedo, sin embargo, dado que la proporción de musculo es mucho mayor que la de hígado, existe una mayor cantidad de glucógeno muscular haciendo más evidente el daño en este tejido (Voet, *et al.*, 2006).

La visión que se tiene acerca del mecanismo patológico por el cual ocurre la acumulación de glucógeno intralisosomal es incompleta. Por muchos años se había creído que la ruptura de los lisosomas generada por la acumulación de glucógeno era la causa principal del daño muscular observado en la EP. La opinión predominante planteada hace más de 20 años, consistía en la hipótesis de que los lisosomas contenidos en las células musculares tenían poco espacio para expandirse y se producía tensión mecánica como resultado de la acumulación de glucógeno, conllevando a la ruptura de la membrana lisosomal (Griffin, 1984). Esta postura se mantuvo hasta el 2008 donde se consideraba la ruptura lisosomal como la patología universal que desencadenaba el daño muscular en la EP, al afectar el aparato contráctil de las fibras musculares (Drost, *et al.*, 2008).

Estudios posteriores han expuesto la visión incompleta de esta hipótesis. Shea y cols (2009) demostraron mediante un modelo de ratón knockout GAA, que en gran medida la causa de la patología de esta enfermedad consiste en el fracaso de la autofagia productiva en tejidos musculares, específicamente en fibras musculares tipo II. La falla de la autofagia productiva es responsable de la acumulación de proteínas potencialmente tóxicas que causan el profundo daño muscular en el ratón con Pompe.

## **2.4 Antecedentes**

El primer caso de Enfermedad de Pompe fue descrito en el año 1932 por el médico patólogo Holandés Johannes Cassianus Pompe, quien documentó el caso de una niña de 7 meses de edad que falleció por Cardiomiopatía Hipertrófica Idiopática, y cuyo cuadro clínico se caracterizaba por debilidad muscular generalizada. Anteriormente se habían descrito casos con el mismo cuadro clínico, sin embargo, fue Pompe quien hizo la observación de que la sintomatología que presentaban estos lactantes se asociaba con la acumulación masiva de glucógeno en los tejidos afectados (Van Gijn, *et al.*, 2011).

En 1954 G.T. Cori determinó el proceso catalítico que sufre el glucógeno, clasificando este trastorno como enfermedad por almacenamiento de glucógeno tipo II (GSDII) y describió la alteración metabólica del glucógeno en los pacientes afectados (Cori, 1954).

En 1955 De Duve descubrió la existencia de un nuevo organelo celular que nombró como lisosoma, y lo describió como un compartimento o cuerpo celular en cuyo interior se almacenan sustancias (De Duve, 1955). Años después, en 1963 H. G. Hers descubrió que la acumulación de glucógeno en la enfermedad de Pompe era causada por la deficiencia de la enzima lisosomal GAA, contribuyendo así a una mejor comprensión de la fisiopatología de la Enfermedad de Pompe así como de otras enfermedades por depósito lisosomal (Hers, 1963).

## **2.5 Manifestaciones Clínicas**

La Enfermedad de Pompe presenta un amplio espectro clínico que varía en la edad de inicio, el órgano involucrado, la severidad y la velocidad de progresión (Kishnani *et al.*, 2006). Los límites entre el diverso espectro de manifestaciones distan de estar definidos. Lo que está mejor delimitado es que los pacientes con manifestaciones antes del primer año de vida presentan una afección cardíaca severa y en los que inician después de los dos años de edad predominan los síntomas neuromusculares (Kishnani *et al.*, 2004). Así mismo, se ha observado en cultivos de fibroblastos, que en el primer grupo de pacientes la actividad de la GAA es

menor al 1%, mientras que en el segundo grupo de pacientes la actividad de la enzima varía entre 2 y 40% de la actividad normal (Kishnani *et al.*, 2006). Estos patrones clínicos han permitido separar la enfermedad en dos variantes principales: la variante infantil o clásica (EPC) y la variante de inicio tardío (EPT), que incluye a las subvariantes juvenil y adulta.

### **2.5.1 Enfermedad de Pompe Clásica (EPC)**

La variante clásica de Enfermedad de Pompe se caracteriza por el inicio temprano de las manifestaciones clínicas, que incluyen dificultad para la alimentación, infecciones respiratorias recurrentes, falla cardíaca, poca movilidad e hipotonía. La afección cardíaca es grave y en la mayoría de las ocasiones provoca la muerte (Winkel *et al.*, 2005).

Cerca del 75 % de los pacientes que presentan esta variante clínica mueren antes de los 12 meses de edad con una media de 8.7 meses, como consecuencia de la insuficiencia cardiopulmonar (van den Hout *et al.*, 2003, Kishnani *et al.*, 2006). Los síntomas aparecen por primera vez a una edad media de 2 meses y se confirma el diagnóstico a una edad media de 4,7 meses. En la mayoría de los casos la sintomatología característica de la enfermedad se reporta a una edad media de 4.0 meses, la cual incluye la aparición de cardiomegalia, cardiomiopatía, hipotonía, debilidad muscular, dificultad respiratoria, retraso en el desarrollo (Kishnani *et al.*, 2006) y dificultades en la alimentación. Esta última es consecuencia de la hipotonía facial, macroglosia, debilidad en la lengua y/o falta de habilidades motoras (Van Gelder *et al.*, 2012). La sintomatología es variable, sin embargo, en la mayoría de los casos se define por el mismo patrón de aparición y severidad. En un estudio realizado por Kishnani y cols en el 2006, en una revisión de 168 casos procedentes de distintos países, se observó que el 92% presentaba cardiomegalia, 88% hipotonía y miocardiopatía, 78% dificultad respiratoria, 63% debilidad muscular y 57% dificultad para la alimentación (Kishnani *et al.*, 2006).

Los problemas cardiológicos inician desde el nacimiento con falla cardíaca antes de los 8 meses de vida (Fayssoil *et al.*, 2008), y la miocardiopatía es predominante en estos pacientes como consecuencia de acumulación de glucógeno en el miocardio. Sin embargo, cada vez se reconocen más pacientes con EPC atípica en los cuales predominan las manifestaciones musculares sin cardiomiopatía (Winkel, 2005).

La hipertrofia cardíaca inicia en el útero y llega a ser significativa en los primeros meses de vida. La cardiomegalia masiva es evidente en rayos X, y el elecocardiograma permite identificar el incremento en el grosor de las paredes ventriculares y el septum intraventricular que lleva a

la obstrucción del ventrículo izquierdo. (Di Rocco *et al.*, 2007). Las anomalías en el proceso de conducción cardíaca son consecuencia de la interferencia del almacenamiento de glucógeno con los tejidos conductivos, teniendo como principal consecuencia taquiarritmias que pueden causar muerte súbita (Di Rocco, 2007).

En general, se considera que a menor actividad residual de la enzima más tempranamente se iniciarán las manifestaciones clínicas y por ende su gravedad. En pacientes con manifestaciones clínicas en los primeros meses de la vida la EP se caracteriza por presentar una actividad de la GAA menor al 1% (Barba *et al.*, 2012).

### **2.5.2 Enfermedad de Pompe Tardía (EPT)**

La presentación clínica de la Enfermedad de Pompe de inicio tardío es muy variable respecto a edad de aparición, órgano afectado, grado de miopatía y ritmo de progresión. Es generalmente progresiva y su evolución no siempre se relaciona con la edad de aparición (Müller *et al.*, 2007). Inicia después del primer año de vida y se caracteriza por debilidad proximal de los miembros inferiores, de los músculos paraespinales, del diafragma y de los músculos accesorios respiratorios, lo cual provoca apnea obstructiva del sueño progresiva y falla respiratoria crónica (Winkel *et al.*, 2005).

En la forma de inicio tardío, la actividad residual de GAA en fibroblastos de piel varía desde el 2 hasta el 40% de su actividad normal (Kishnani *et al.*, 2004), generando un amplio espectro de síntomas y edades de aparición que la permiten clasificar a la variante en las formas juvenil y adulta.

#### **Forma Juvenil**

Esta subvariante suele presentarse en un grupo heterogéneo de pacientes mayores a 1 año de edad cuyo cuadro clínico se caracteriza por la manifestación de afecciones musculares que no incluyen cardiomiopatía grave (Kishnani, 2006). Los primeros síntomas inician desde el primer año de vida hasta los 10 años, y el promedio es de 3 años. Las manifestaciones iniciales incluyen retraso para la adquisición de habilidades motoras y problemas para subir y bajar escaleras, caídas frecuentes y dificultad para la deambulación (Kishnani, 2009).

La presentación juvenil de esta enfermedad se caracteriza una actividad residual de la enzima GAA del 10% (Barba *et al.*, 2012).

## **Forma Adulta**

Esta subvariante de Enfermedad de Pompe se caracteriza por la progresión lenta de la miopatía que afecta predominantemente al músculo esquelético. Se presenta desde la segunda hasta la sexta década de vida (Kishnani, 2006).

Los pacientes afectados muestran debilidad de la musculatura proximal de la cintura pélvica y de hombros, músculos paraespinales y del cuello (American Association of Neuromuscular & Electrodiagnostic Medicine, 2004). Es el subtipo de EP menos agresivo y se caracteriza por una actividad de la enzima GAA menor al 40% (Barba *et al.*, 2012).

## **2.6 Tratamiento**

En el año 2006 se aprobó la terapia de reemplazo enzimático (TRE) como una alternativa para tratar la enfermedad permitiendo modificar su curso fatal cuando el diagnóstico es oportuno y certero (Kishnani *et al.*, 2007). La terapia de reemplazo enzimático hace que en la actualidad el diagnóstico oportuno sea de vital importancia para mejorar las funciones cardíacas, respiratorias y motoras e incrementar la sobrevida cuando el tratamiento se inicia de forma inmediata (Güngör *et al.*, 2011).

El reporte de ensayos clínicos en pacientes con EP de inicio infantil han mostrado que la TRE prolonga la tasa de sobrevida (Van den Hout, *et al.*, 2000), disminuye la cardiomegalia y mejora la función muscular esquelética. Así mismo en un estudio realizado por Winkel en el 2004 se observa la estabilización y disminución de los síntomas respiratorios y motores en pacientes con EP de inicio tardío (Winkel *et al.*, 2004).

## **2.7 Gen alfa glucosidasa ácida**

El gen alfa glucosidasa ácida (GAA) es el único gen involucrado en el desarrollo de la Enfermedad de Pompe. Se localiza en el brazo largo del cromosoma 17 entre las bandas 25.2 y 25.3 (17q25.2-q25.3). entre los pares de bases 80,101526 y 80119882 (GRCh38.p2) (Fig. 2). Contiene 20 exones y 19 intrones extendidos sobre una distancia de 20 kb (Hoefsloot *et al.*, 1990). El primer exón tiene solamente una secuencia 5' no traducida, y está separado por aproximadamente un intrón de 2.7 kb, del segundo exón que contiene la secuencia del codón de inicio ATG (Martiniuk, 1991) de 3,6 Kb.

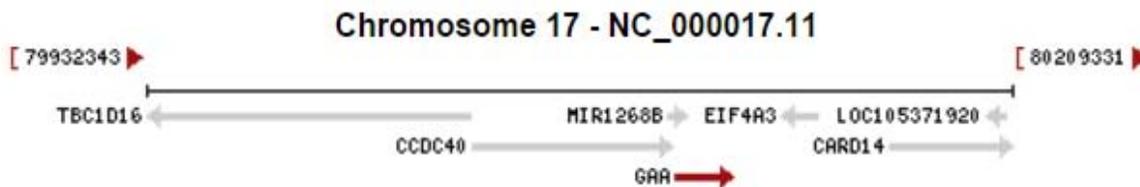


Figura 2. Localización del gen GAA dentro del cromosoma 17, entre los pares de bases 80101526 y 80119882 (GRCh38.p2). Tomada de NCBI

El gen *GAA* produce un ARN mensajero de 3.6 kb que codifica para una hidrolasa del mismo nombre: alfa glucosidasa ácida (*GAA*, EC 3. 2.1.20/3) que es una enzima lisosomal que cataliza la hidrólisis de los enlaces glucosídicos  $\alpha$ -1,4 y  $\alpha$ -1,6 del glucógeno, llevándolo a glucosa (Hoefsloot *et al.*, 1988, Sugawara *et al.*, 2009).

## 2.8 Proteína alfa glucosidasa ácida

La enzima alfa glucosidasa ácida cuenta con 952 aminoácidos que incluyen en la parte amino terminal un péptido señal para su transporte al lumen en el retículo endoplásmico (Hirschhorn, 2001). Es allí donde la enzima es N-glicosilada en sus siete sitios de glicosilación y adquiere un peso molecular de 110 kDa. Posteriormente es transportada al aparato de Golgi donde sufre modificaciones en las cadenas de carbohidratos por fosforilación de los residuos de manosa. Como resultado, se produce una forma intermedia que es internalizada a los lisosomas mediante reconocimiento vía manosa 6 fosfato (Hermans *et al.*, 1993). Dentro del lisosoma sufre subsecuentes modificaciones post-traduccionales mediante procesamiento proteolítico en la cadena peptídica principal. Se produce una primera forma intermedia de 95 kDa que es clivada proteolíticamente en su extremo carboxilo terminal generando otra forma intermedia (funcional) de 76 kDa que nuevamente es clivada en su extremo amino terminal resultando en una enzima madura de 70 kDa (204-781 aa) (Moreland *et al.*, 2005).

En la actualidad no se ha determinado la estructura de la proteína por cristalografía, sin embargo mediante el modelado de su homólogo glucoamilasa intestinal humana se han hecho aproximaciones de su estructura más probable, y se han identificado 5 dominios principales: un dominio trefoil tipo-P (entre los residuos 89-135), un dominio N-terminal  $\beta$ -sandwich (entres los residuos 136-346), un barril catalítico ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub> (residuos 347-723), un dominio C-terminal-proximal (residuos 724-818) y un domino C-terminal distal (residuos 818-952) (Sugawara *et al.*, 2009).

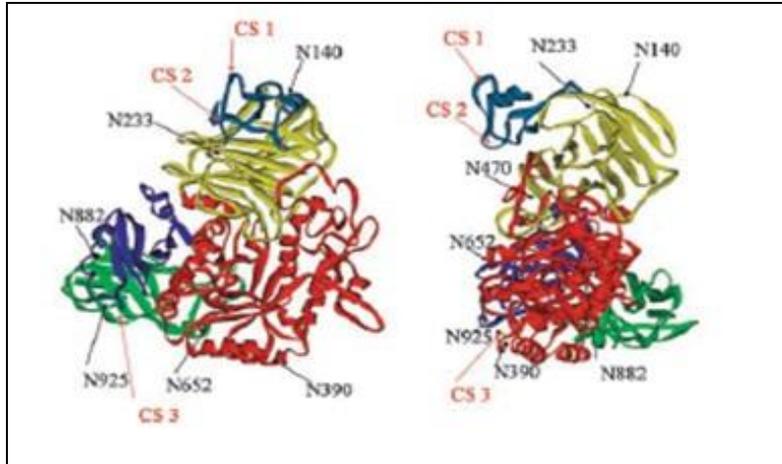


Figura 3. Predicción de la estructura de la GAA. Dominio trefoil tipo-P (cian), dominio N-terminal  $\beta$ -sandwich (amarillo), dominio catalítico barril ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub> (rojo), dominio C-terminal-proximal (azul) y dominio C-terminal distal (verde). Flechas negras representan los sitios de glicosilación. Vista frontal (izquierda), vista lateral (derecha) (Referencia: Sugawara *et al.*, 2009).

La actividad catalítica de la enzima está localizada en los residuos Asp518 y Asp616 ubicados en el dominio N-terminal  $\beta$ -sandwich y los siete sitios predictivos de glicosilación se encuentran ubicados en las posiciones: 140, 233, 390, 470, 652, 882 y 925 de la proteína (Sugawara *et al.*, 2009). Los sitios Asp-882 y Asn-925 se encontraron localizados en C-terminal del propéptido que es clivado durante la maduración. La eliminación de seis de los siete sitios no altera la síntesis o función de la enzima, sin embargo, al remover el segundo sitio de glicosilación Asn-233 se interfiere dramáticamente con la formación de la enzima madura (Hermans *et al.*, 1993).

## 2.9 Mutaciones en el gen GAA

La base de datos de mutaciones de Enfermedad de Pompe (Pompe Disease Mutation Database), actualizada por última vez en el 2015, reporta un total de 524 variantes localizadas a lo largo de la secuencia del gen GAA causante de EP. Dentro de esta lista 164 variantes se reconocen como muy severas (Clase A), 138 como potencialmente severas (Clase B), 30 como menos severas (Clase C), 22 como potencialmente leves, 4 como probablemente no patogénicas (Clase F) y 72 de efecto desconocido (<http://www.pompecenter.nl/>).

En su mayoría estas clasificaciones se pueden correlacionar con las formas clínicas en las que se presenta la enfermedad, así como con el grado de actividad enzimática. Se ha observado que la mayoría de las veces en que las manifestaciones clínicas aparecen tempranamente se acompañan de un fenotipo severo con una actividad enzimática nula, mientras que las manifestaciones clínicas que se presentan a una edad avanzada generalmente se asocian a un

fenotipo menos severo y la enzima presenta mayor funcionalidad. La EP infantil es causada por una mutación patogénica en cada uno de los alelos del GAA, impidiendo la formación de una enzima funcional, mientras que en los casos de EP con fenotipos menos severos tienen por lo menos una variación de la secuencia que permite la síntesis de nivel normal o bajo de la enzima (Kroos *et al.*, 2007; Kroos *et al.*, 2010) con una actividad residual de hasta un 23% en promedio (Kroos *et al.*, 2007), donde el genotipo y la actividad enzimática de estos pacientes no son siempre predictivos de la edad de inicio y la progresión de la enfermedad. Además, se reportan algunos casos clínicos donde la correlación genotipo fenotipo no es nada clara pudiendo deberse a la participación de otros mecanismos moleculares aún desconocidos.

Las tres mutaciones más frecuentes son la p.Arg854X, p.Asp645Glu y la c.IVS1-32- 13T>G que se encuentran en alrededor del 50-80% de los casos en niños y adultos con un cuadro lentamente progresivo (Hermans *et al.*, 2004). La mutación p.Arg854 se asocia frecuentemente con la enfermedad de Pompe infantil, y se observa en hasta el 60% de las personas de ascendencia africana (Africanos y Afroamericanos) que tuvieron un haplotipo común, sugiriendo efecto fundador (Becker *et al.*, 1998). La mutación p.Asp645Glu se encuentra en poblaciones Asiáticas (chinos) y se asocia con un haplotipo, lo que sugiere un efecto fundador (Shieh *et al.*, 1998).

Las mutaciones más frecuentes en poblaciones caucásicas son la c.2481\_102\_2646\_31del (delexon18; p.G828\_N882del), c.525del (delT525; p.E176fsX45) que se asocian a la variante infantil, (van den Hout, 2003), la c.925G>A (p.G309R) (Hirschorn, 2001; Kross, 2007) y la p.Glu925Arg (Labrousse *et al.*, 2010).

Las mutación p.Glu176Argfs \* 45 (c.525delT) y la delección del exón 18 (p.Gly828\_Asn882del; (c.2482\_2646del) son mutaciones muy frecuentes en poblaciones Holandesas, caracterizadas por la insignificante actividad de la enzima GAA y deben de ser consideradas como alteraciones altamente graves (Van der Kraan *et al.*, 1994).

## **2.10 Epidemiología**

La prevalencia exacta de la Enfermedad de Pompe en la población general es desconocida. A nivel mundial se estima un caso de EP con manifestaciones en los primeros meses de vida (variante temprana) por cada 138,000 nacimientos y de un caso de EP con manifestaciones después del primer año de vida (variante tardía) por cada 57,000 nacimientos, de tal manera que la prevalencia mundial estimada es de un caso por cada 40,000 nacimientos (Ausems *et*

*al.*, 1999). Sin embargo, estos datos varían entre las diferentes formas clínicas y grupos étnicos (Raben *et al.*, 2002).

En general existen escasos datos epidemiológicos que permitan conocer la prevalencia de la enfermedad en los distintos países, ya que al ser considerada como una enfermedad huérfana (incidencia menor de 1 por cada 5,000 personas) se da poca importancia a su estudio. La prevalencia de Enfermedad de Pompe variante infantil es más alta en poblaciones afroamericanas y orientales (sur de China/Taiwan) en donde se reporta un caso por cada 14,000 personas (Hirschhorn *et al.*, 2001) y un caso por cada 50,000 personas (Lin *et al.*, 1987) respectivamente. Mientras que en poblaciones holandesas la prevalencia de esta misma presentación clínica de la enfermedad es más baja, con un caso por cada 137,000 personas (Ausems *et al.*, 1999; Poorthuis *et al.*, 1999).

En Estados Unidos y Holanda no existe variación de la prevalencia combinada con respecto a la prevalencia mundial ya que para ambas se reporta un caso por cada 40,000 personas (Martiniuk *et al.*, 1998; Ausems *et al.*, 1999). Mientras que en poblaciones australianas la prevalencia es menor presentándose un caso de EP por cada 145,000 personas (Meikle *et al.*, 1999).

Para Europa se reporta un caso con la variante infantil por cada 100,000 personas y un caso con la variante tardía por cada 60,000 personas (Martiniuk *et al.*, 1998).

Hasta el 2011 se encontraban 742 pacientes en el Registro Internacional de la Enfermedad de Pompe, con casos provenientes de 28 países (Byrne, *et al.*, 2011). Sin embargo, estos datos epidemiológicos resultan insuficientes para conocer la incidencia de la enfermedad en ciertas regiones. En México no existen datos epidemiológicos que permitan conocer la frecuencia de la EP, sin embargo, por algunas fuentes se puede estimar que se han diagnosticado menos de 100 casos, entre los que se incluyen pacientes fallecidos (Ausems *et al.*, 1999).

### **2.11 Antecedentes directos**

En el 2013 se identificaron tres casos con la variante infantil de la Enfermedad de Pompe, provenientes de la misma región de la Huasteca del país.

El primer caso reportado corresponde a un lactante de 6 meses remitido desde su centro de Salud ubicado en la comunidad de Papatlaco, Tamazunchale, SLP, al Hospital “Ignacio Morones Prieto” ubicado en la capital del mismo, después de una semana de presentar fiebre,

tos productiva y dificultad respiratoria sin respuesta alguna al tratamiento por infección. La historia clínica del niño mostró dos hospitalizaciones previas a causa de neumonía. Así mismo se reportó retraso motor e incapacidad para sostener la cabeza y sentarse. El examen abdominal mostró hepatomegalia y las radiografías de tórax mostraron cardiomegalia (Fig. 4). El niño falleció tres semanas después de su ingreso al hospital. Los exámenes histológicos mostraron acumulación de glucógeno en el músculo cardíaco, hígado y musculo esquelético (Fig. 4).

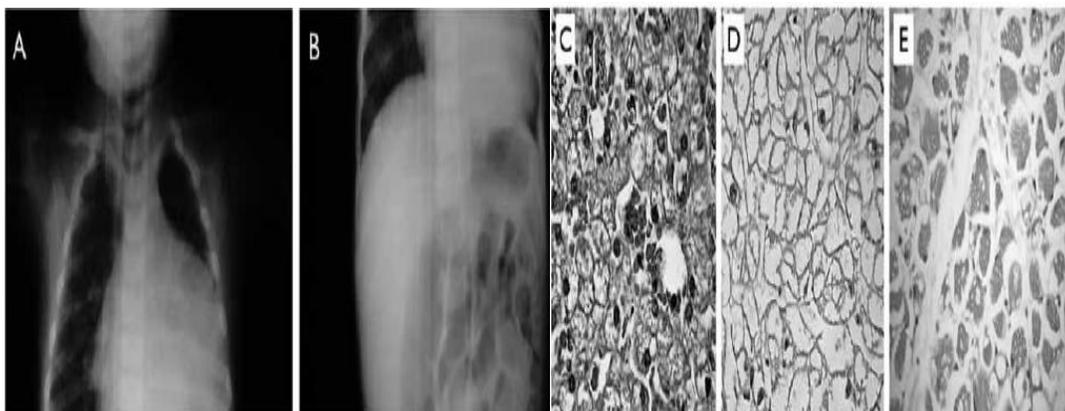


Figura 4. Radiografías de tórax del caso 3 con EP mostrando: A) cardiomegalia conspicua; B) Hepatomegalia. Preparaciones histopatológicas posmortem mostrando: C) crecimiento de células del miocardio con un aspecto vacuolado con desplazamiento de miofibrillas. Los hepatocitos D) y las células de la musculatura esquelética E) muestran un patrón de mosaico con células ligeramente agrandadas y evidente vacuolización citoplasmática (Referencia: Esmer *et al.*, 2013).

El segundo caso corresponde a un niño de 7 meses de edad referido al mismo Hospital después de un historial de 4 meses de repetidas infecciones respiratorias. El infante resultó ser residente de la comunidad de Emiliano Zapata, Tamazunchale, SLP, una comunidad aleada a la comunidad de Papatlaco, donde se reportó el primer caso del padecimiento. El infante ingreso al hospital días después de ser tratado en la clínica de su localidad, debido a fiebre, tos productiva, dificultad para respirar e insuficiencia cardíaca. El infante presentaba piel pálida, severa hipotonía generalizada, macroglosia, hipoventilación basal derecha y hepatomegalia. El paciente murió pocas horas después de su ingreso.

La sospecha de Enfermedad de Pompe fue corroborada mediante la secuenciación del gen alfa glucosidasa ácida, único gen involucrado en el desarrollo de la enfermedad. Los afectados presentaron la mutación c.1987delC del gen GAA en estado homocigoto, una mutación antes no reportada en ningún lugar del mundo.

Posteriormente se reportó un nuevo caso correspondiente a un niño menor al año de edad, cuyos síntomas indicaban el diagnóstico de la Enfermedad de Pompe, que falleció antes de poder realizar el estudio molecular. Existe la sospecha de que se trate de la misma mutación ya que el niño resultó ser residente de la comunidad de Tetlalpan en el municipio de Chapulhuacan, Hidalgo, la cual se ubica a pocos kilómetros del municipio de Tamazunchale, SLP, donde se reportaron los dos casos de Enfermedad de Pompe (Esmer *et al.*, 2013).

### 3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La Enfermedad por almacenamiento de glucógeno tipo II, también conocida como Enfermedad de Pompe (EP), es un trastorno autosómico recesivo de baja incidencia. A nivel mundial se ha reportado un caso por cada 138,000 nacimientos en los primeros meses de vida (variante temprana) y un caso por cada 57,000 nacimientos después del primer año de vida (variante tardía). Se estima que la incidencia combinada de ambas variantes es de un caso por cada 40,000 nacimientos, sin embargo, se desconoce la prevalencia exacta en la población general ya que la frecuencia estimada varía entre las diferentes formas clínicas y grupos étnicos (Raben *et al.*, 2002).

La prevalencia de EP reportada en poblaciones europeas (Holanda) y asiáticas (China) es de 1 caso en 40,000 y 1 caso en 50,000 personas respectivamente, mientras que en Australia es de 1 en 145,000 (Meikle *et al.*, 1999). No existen datos epidemiológicos que permitan conocer la frecuencia de EP en México, ya que únicamente se mencionan 100 casos sospechados o diagnosticados por autopsia (Ausems *et al.*, 1999).

Recientemente se identificaron tres casos no emparentados con la variante infantil de la EP en el Hospital Central "Dr. Ignacio Morones Prieto", los tres provenientes de una región de la Huasteca del país. Dos de los afectados (caso 1 y 2), provenientes del municipio de Tamazunchale, SLP, presentaron la mutación c.1987delC del gen GAA en estado homocigoto. El tercer afectado, proveniente del municipio de Chapulhuacan, Hidalgo, localizado a muy pocos kilómetros de Tamazunchale no logro ser diagnosticado molecularmente.

La mutación c.1987delC del gen GAA que consiste en la delección de una citocina, es una nueva mutación previamente no reportada en ninguna región del mundo. Afecta el marco de lectura (fs), por lo que un residuo de glutamina es sustituido por un residuo de serina en el codón 663, alterando el subsecuente marco de lectura de la proteína. El nuevo marco de

lectura termina en codón de paro en la posición 33 (pGln663SerfsX33), y produce una proteína truncada de funcionalidad escasa (Esmer *et al.*, 2013).

Los padres del primer afectado nacieron en Papatlaco, una comunidad perteneciente al municipio de Tamazunchale localizada en la Huasteca Potosina, en la que se identificaron aproximadamente un 80% de habitantes con el mismo apellido, lo que sugiere un alto grado de consanguinidad. Los padres del caso dos son residentes de Emiliano Zapata, una comunidad del municipio de Tamazunchale muy cercana a Papatlaco.

Debido a que este padecimiento tiene un carácter autosómico recesivo, se piensa que la frecuencia de portadores en esta área geográfica está incrementada y por lo tanto puede constituir una región de alta prevalencia de la enfermedad.

En la Enfermedad de Pompe la frecuencia de homocigotos se relaciona casi siempre con eventos de consanguinidad o endogamia. Se requiere estudiar la prevalencia de la mutación para determinar si en las comunidades de origen de estos casos se presenta una frecuencia más alta de portadores de la mutación.

La mayoría de las mutaciones causantes de EP son exclusivas de poblaciones que residen dentro de la misma región geográfica, y generalmente los individuos portadores de la mutación comparten origen ancestral en común. La mutación p.Arg854 se asocia frecuentemente con la EP infantil, y se observa en personas de ascendencia africana, mientras que la mutación p.Asp645Glu se encuentra únicamente en poblaciones Asiáticas.

Encontrar la misma mutación en diferentes poblaciones de individuos que habitan dentro de la misma región geográfica y que comparten la misma ancestría podría explicarse mediante un efecto fundador, el cual implica la migración de un número reducido de individuos de la población original y su establecimiento en una nueva región geográfica. La formación de una nueva población a partir de un número reducido de alelos implicará la pérdida de la variabilidad genética aumentando la probabilidad de que los descendientes presenten alelos extremadamente raros que resultarán frecuentes en la nueva población. Los individuos que hereden estos alelos compartirán el mismo haplotipo para el alelo mutado ya que todos serán descendientes del mismo individuo, y tendrán una alta proporción del componente ancestral de la población a partir de la cual se originaron. Dado que en las tres comunidades que estudiamos se encontró la misma mutación (antes no reportada), se cree que los individuos portadores de la mutación pueden ser el resultado de la formación de una nueva población a

partir de un efecto fundador, por lo que resulta interesante estudiar el componente ancestral y perfil de haplotipos de estos individuos.

#### **4. JUSTIFICACIÓN**

La Enfermedad de Pompe es una enfermedad de carácter autosómico recesivo, en la que la frecuencia de homocigotos se relaciona casi siempre con eventos de consanguinidad o endogamia. Por lo tanto, al encontrar tres casos no emparentados de EP homocigotos para la misma mutación en tres comunidades cercanas de una zona de la Huasteca del país, en la que se reconoce un alto grado de endogamia se piensa que tal región presentara una alta prevalencia de portadores del alelo mutado.

Se sabe que la evolución de la EP puede ser modificada con la Terapia de Reemplazo Enzimático (TRE) en cuanto se establece el diagnóstico y a su vez, el diagnóstico de portador sano tiene implicaciones en la prevención primaria de los padecimientos genéticos al identificar a los individuos en riesgo de tener un hijo enfermo. Por lo cual conocer la prevalencia de portadores del alelo mutado permitirá establecer las bases epidemiológicas para justificar un programa preventivo de la enfermedad por parte de la Secretaria de Salud del Estado y establecer la magnitud real del problema en cuanto a la frecuencia de portadores y casos afectados por EP para los habitantes de la región.

Cabe mencionar que en la actualidad se reconoce la existencia de más de 300 mutaciones diferentes responsables del desarrollo de la Enfermedad de Pompe, y continuamente se describen nuevas variantes, en las que no siempre es posible correlacionar el genotipo con la severidad de la enfermedad mostrando la complejidad molecular del diagnóstico. Por lo que describir las nuevas mutaciones causantes de la EP proporcionará más información que permita conocer más a fondo esta enfermedad y facilitará la generación de un diagnóstico más amplio y certero.

Por otro lado, conocer la ancestría de los individuos portadores, así como determinar su perfil de haplotipos permitirá confirmar si estos individuos son el resultado de la formación de una nueva población a partir de un efecto fundador.

## **5. HIPOTESIS**

Debido a que la EP tiene una herencia autosómica recesiva se encontrará una alta prevalencia de portadores de la mutación c.1987delC causante de la EP en tres comunidades altamente endogámicas de la Huasteca del país donde recientemente se reportaron tres casos no emparentados de la variante infantil de la enfermedad.

Los individuos portadores de la mutación c.1987delC de tres comunidades indígenas que se encuentran dentro de la misma región geográfica tendrán el mismo ancestro como resultado de la formación de una nueva población a partir de un efecto fundador.

## **6. OBJETIVOS**

### **6.1 Objetivo General**

- ▶ Conocer la prevalencia de portadores, así como el origen ancestral de la mutación c.1987delC en el gen GAA, causante de la EPC, en individuos de tres comunidades indígenas de una zona de la Huasteca del País.

### **6.2 Objetivos Particulares**

- ▶ Identificar la prevalencia de portadores de la mutación c.1987delC en las comunidades de Papatlaco (Tamazunchale, SLP), Emiliano Zapata (Tamazunchale, SLP) y Tetlalpan (Chapulhuacan, Hidalgo).
- ▶ Determinar la ancestría global y local de cuatro individuos de la familia del caso tres con EP, así como de dos individuos de las comunidades restantes.
- ▶ Buscar la presencia de un haplotipo en común compartido por los individuos portadores.

## **7. MATERIAL Y MÉTODO**

El estudio se realizó en dos etapas, la primera correspondiente al trabajo en campo para la obtención de muestras, y la segunda correspondiente al análisis de la muestra para determinar la prevalencia y el origen ancestral de la mutación.

## 7.1 Muestreo

### 7.1.1 Descripción del Área de Estudio

- **Papatlaco**

Papatlaco Santiago es una comunidad perteneciente al municipio de Tamazunchale. Se localiza al sureste del Estado de San Luis Potosí, entre las coordenadas geográficas 21.1333° Lat Norte y 98.85° Long Oeste a 900 msnm. Cuenta con 810 habitantes, de los cuales 418 son hombres y 392 mujeres. El índice de fecundidad de la población femenina es de 2.86 hijos por mujer. El porcentaje de analfabetismo entre los adultos corresponde al 16.79% (14.11% de los hombres y 19.64% de las mujeres) y el grado de escolaridad es de 5.01 (5.39 en hombres y 4.59 en mujeres). Papatlaco es considerada como una comunidad indígena ya que la mayor parte de la población adulta correspondiente al 77.9% habla alguna lengua indígena (INEGI, 2010).

- **Emiliano Zapata**

Emiliano Zapata es una localidad perteneciente a la Huasteca Potosina. Se ubica en el municipio de Tamazunchale, en el sureste del estado de SLP, a 780 msnm entre las coordenadas geográficas 21.191667° Lat Norte y 98.871389° Long Oeste. El último censo realizado por INEGI en el 2010 reporta 193 habitantes, de los cuales 109 son hombres y 84 son mujeres. El índice de fecundidad de la población femenina es de 2.55 hijos por mujer. El porcentaje de analfabetismo en adultos es del 17.62% (14.68% en los hombres y 21.43% en las mujeres) y el grado de escolaridad es de 4.82 (4.80 en hombres y 4.85 en mujeres). El 49.74% de la población habla una lengua indígena (INEGI, 2010).

- **Tetlalpan**

Tetlalpan es una comunidad indígena ubicada en el municipio de Chapulhuacán, al norte del estado de Hidalgo. Se localiza entre las coordenadas geográficas 21.179722° Lat Norte y 98.857500° Long Oeste a 460 msnm. Cuenta con 427 habitantes, de los cuales 232 son hombres y 195 son mujeres. El índice de fecundidad es de 3.02 hijos por mujer. El grado de analfabetismo reportado en adultos corresponde al 21.78% (14.66% en los hombres y 30.26% en las mujeres) y el grado de escolaridad corresponde a 3.99 (4.32 en hombres y 3.56 en mujeres). El 80.8% de la población adulta habla alguna lengua indígena (INEGI, 2010).

### **7.1.2 Población de estudio**

Se incluyeron en el estudio un total de 352 individuos, 191 residentes de la comunidad de Papatlaco, SLP (caso 1) de una población de 810 habitantes, 116 residentes de Emiliano Zapata, SLP (caso 2) de una población de 193 habitantes, y 45 residentes de Tetlalpan, Hidalgo (caso 3) de una población de 427 habitantes.

Adicionalmente se incluyeron como controles 100 individuos provenientes de distintas partes de estado de SLP pertenecientes a la cohorte de pacientes del Hospital Central Ignacio Morones Prieto, SLP, así como 100 individuos pertenecientes a la cohorte de trabajadores del IMSS Morelos, proporcionada por el INMEGEN.

Cabe mencionar que el proyecto cuenta con la aprobación de la Secretaría de Salud del Estado y el comité de ética e investigación en del Hospital Central.

### **Criterios de inclusión**

- Hombres y mujeres mayores de edad con padres y abuelos nacidos en las comunidades de Papatlaco, Emiliano Zapata y Tetlalpan que hayan aceptado participar en el estudio y que hayan firmado el consentimiento informado aprobado por la Secretaría de Salud del estado y el comité de ética e investigación del Hospital Central.
- Menores de edad con padres y abuelos nacidos en alguna de las tres comunidades de estudio, que hayan dado el asentimiento para participar en el estudio y cuyos padres hayan firmado el consentimiento informado.

### **Criterios de Eliminación**

- Deseo de eliminar su muestra del análisis.
- Cuando la calidad de la muestra no permita la extracción de ADN.

### **7.1.3 Fase preliminar**

Se acudió a las tres comunidades de interés para conocer las características geográficas y de acceso a los servicios de salud. Se realizaron entrevistas al personal de salud y a algunos integrantes de la comunidad.

#### **7.1.4 Toma de muestra**

La toma de muestra consistió en la extracción de 5 ml de sangre periférica en tubos con EDTA a cada participante del estudio. Se elaboró una base de datos de los participantes con datos que incluían nombre completo, edad y parentesco.

#### **7.2 Prevalencia**

Con la finalidad de determinar la prevalencia de portadores de la mutación, se realizó la genotipificación de una secuencia del gen *GAA* a los participantes del estudio así como a 200 sujetos adicionales que fueron tomados como controles. Para ello se realizó la extracción de ADN, seguida de la genotipificación de la mutación c.1987delC del gen *GAA* mediante una PCR tiempo real. Los resultados fueron validados por secuenciación automatizada.

##### **7.2.1. Procesamiento de las muestras**

- **Extracción de ADN**

La extracción de ADN se realizó mediante muestras de sangre periférica, siguiendo el protocolo de extracción del kit QUIAGEN® de la siguiente manera: Se transfirió a tubos falcon de 15 ml, el volumen total de sangre periférica contenido en los tubos vacutainer. A cada tubo se le adicionaron 9 ml de la solución de lisis de glóbulos rojos (RBC) y se mezclaron por inversión. Las muestras se dejaron incubar por 30 minutos a temperatura ambiente mezclándolas ocasionalmente. Pasado este tiempo se centrifugaron a 3000 rpm durante 15 minutos. El sobrenadante resultante se desechó, obteniendo un botón de células blancas en el fondo del tubo. Estas células fueron lavadas con 500 µL de RBC con ayuda de un agitador vortex. Posteriormente a cada tubo se le adicionaron 3.5 ml de la solución de lisis de células blancas mezclando con ayuda de un agitador vortex hasta que desaparecieran los restos celulares por completo. Se adicionó 1 ml de solución precipitadora de proteínas y se mezcló nuevamente con un agitador vortex por 30 segundos. Las muestras fueron colocadas en hielo durante 15 minutos y pasado este tiempo se centrifugaron a 3500 rpm durante 10 minutos. La mezcla obtenida se agitó mediante un agitador vortex sin despegar el botón de los restos celulares y se centrifugó nuevamente a 3500 rpm durante 10 minutos. Como resultado se obtuvo una fase sólida formada por los restos celulares y proteínas; y una fase líquida que contenía los ácidos nucleicos. Esta fase líquida fue transferida a un tubo nuevo al que se le adicionaron 5 ml de isopropanol. El contenido del tubo se mezcló por inversión hasta que la hebra de ADN se tornó visible. El tubo se almacenó a -20°C durante toda la noche para aumentar la precipitación del

ADN. Pasado este tiempo se centrifugó a 300 rpm durante 10 minutos. Se desechó el sobrenadante obteniendo un botón de ADN en el fondo del tubo. Se agregó 1 ml de etanol al 70% lavando la solución mediante agitación con ayuda de un agitador vortex. La mezcla se centrifugó a 3000 rpm durante 5 minutos. Se desechó el sobrenadante y se dejó secar el tubo durante toda la noche a temperatura ambiente. Una vez seco el tubo el ADN se hidrató agregando 400 µl de agua. Esta solución se almacenó a 4°C durante toda la noche y pasado este tiempo el ADN hidratado se transfirió a criovial de 2 ml. Por último, se procedió a la cuantificación del ADN mediante un espectrofotómetro NanoDrop 2000 de la marca Thermo Scientific.

- **Integridad del ADN**

Para evaluar la integridad del ADN se realizó una electroforesis, colocando por pozo una mezcla de 2 µl de buffer de carga (compuesto de azul de bromofenol-xilencianol (0.05%: 0.05%) y 5 µl de agua estéril), 2 µl del revelador red gel y 2 µl de la muestra de ADN. La electroforesis se llevó a cabo mediante un gel de agarosa al 1%, bajo las condiciones de 90 volts durante 45 minutos.

### **7.2.2. Genotipificación**

La genotipificación de la mutación c.1987delC se realizó a partir del análisis de las curvas de fusión generadas de una PCR tiempo real (Q-PCR) de una secuencia del gen GAA.

#### **Curvas de fusión de alta resolución (High Resolution Melt)**

La reacción en cadena de la polimerasa se llevó a cabo en el equipo Ligth Cycler® 480 de Roche, mediante la utilización de sondas HybProbe 640 LC y FL, que emiten fluorescencia al hibridarse con el producto de amplificación. Consisten en dos secuencias de ADN que hibridan adyacentemente formando parte de la misma cadena, y cada una de las cuales se encuentra marcada por un fluoróforo específico, la primera por el fluoróforo FL en el extremo 3' hidroxilo y la segunda por el fluoróforo LC en el extremo 5' fosfato. Estas sondas se basan en el principio de Transferencia de Energía de Resonancia Fluorescente (FRET), donde un fluoróforo dador que es excitado por una fuente de luz azul a 470 nm, dona su energía a un fluoróforo aceptor al que se encuentra contiguo (la cercanía entre ambos fluoróforos debe ser de 1 a 5 pb de distancia), generando una emisión de luz por parte de este último, que será captada por uno de los canales del equipo y transformada simultáneamente en información que podrá interpretarse mediante la utilización de un software (Roche Applied Science. 2008).

Uno de los resultados adicionales generados de la Q-PCR es la obtención de las curvas de fusión, que permiten el análisis de genotipificación mediante la comparación de los cambios en la temperatura de fusión a los que hibridan las sondas en muestras diferentes para una misma secuencia de ADN dadas las modificaciones que pueda presentar. La temperatura de fusión depende en gran medida de su secuencia, longitud y contenido de GC, por lo que una modificación en una misma secuencia de ADN generará cadenas de ADN con diferentes temperaturas de fusión (Roche Applied Science, 2008).

Las sondas hyprobe hibridan específicamente a secuencia de ADN, por lo que si existe un SNP en la región a la que se une a la sonda, el heterodúplex sonda-diana se desestabiliza y se funde a una temperatura más baja que un heterodúplex formado entre la sonda y la secuencia perfectamente acoplada. Durante el proceso de hibridación la señal de fluorescencia aumenta, debido a la unión de la sonda con cadena molde generando moléculas de ADN bicentenario (Fig. 5). Los cambios en la señal de fluorescencia se monitorizan continuamente generando curvas de fusión que permiten la detección de SNP (Fig. 6).

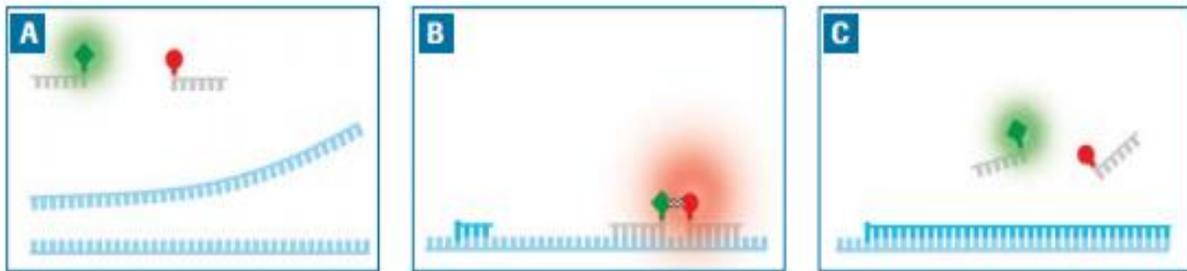


Figura 5. Hibridación de sondas HyProbe. A) Etapa de desnaturalización, donde no ocurre la hibridación de las sondas con el ADN. B) Emisión de fluorescencia dada la hibridación de la sonda con el ADN sintetizado. C) Etapa de elongación que permite la liberación de las sondas. Referencia Roche Applied Science, 2008.

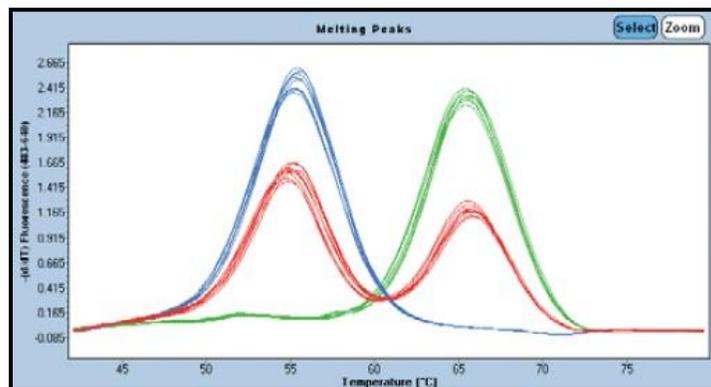


Figura 6. Análisis de curvas de fusión con sondas Hyprobe. Referencia Roche Applied Science, 2008.

## Q-PCR

La técnica de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real se llevó a cabo en el equipo Light Cycler 480 de Roche siguiendo un programa de 45 ciclos de amplificación, cada uno de los cuales se compone de desnaturalización a 95°C por 1 minuto, alineación a 66.5°C por 1 minuto y elongación a 72°C por un minuto. Para cada reacción se agregaron 0.5 µl de los primer Fw y Rv a una concentración de de 10 µM, 0.25 µl de las sondas FC y LC, 2 µl de Mix, 0.8 µl de MgCl<sub>2</sub> y 2 µl de ADN a una concentración de 25 ng/µl. El volumen se ajustó a 10 µl con H<sub>2</sub>O.

El diseño de primers y las sondas fue el siguiente:

Oligo	GAA	NG_009822.1	Tm
GAA F	GACTCTGCCCTCCCAGAAAT	16305-16324	56.8 °C
GAA R	GATCGCCACCTGCCAT	16508-16492	58.9 °C
GAA LC	AGCTGGGTCCAGCGCAC-FL	16424-16407	61.1°C
GAA LC	LC640-CACAGCTCCTCTGAGGTGTTGCC-PPH	16405-16382	64.5°C

### Análisis de las curvas de fusión

El análisis de las curvas de fusión se realizó en el software LightCycler 480 versión 4.05 mediante la comparación visual de las gráficas generadas por el programa.

### 7.2.3 Validación de resultados

Los resultados de la genotipificación fueron validados mediante secuenciación automática (únicamente a aquellos individuos heterocigotos para la mutación, así como a 80 individuos normales). Como primer paso se realizó la amplificación de la secuencia que alberga la mutación mediante una PCR tiempo final. Para ello se realizó el diseño de primers y la estandarización de las condiciones de la corrida. El producto de la PCR se purificó mediante la utilización de columnas de ultracentrifugación separando los primers y los dNTP de la secuencia de ADN de interés. El análisis se realizó mediante la visualización de los cromatogramas generados en el software Fich TV.

## PCR

Se realizó la amplificación de una región correspondiente a 493 pb del exón 14 del gen GAA mediante una PCR punto final. La reacción se llevó a cabo en un termociclador (Applied Biosystems, Foster City, CA) siguiendo un programa de 40 ciclos, cada uno de los cuales comprende una fase de desnaturalización a 95°C por 30 segundos, una fase de alineación a 60°C por 30 segundos y una fase de elongación a 72°C por 30 segundos, extendiéndose esta última por 7 minutos en el último ciclo del programa. La etapa de preincubación se llevó a cabo a 95°C durante 2 minutos. El diseño de los primers fue el siguiente:

Oligonucleotido	Secuencia en sentido 5' 3'	Tm
GAA Fw	5'GACACGCCCATTTGTGATCTCC	69.8 °C
GAA Rv	5' TTCCCAGGGGAGAGTTCTTGG	67.6 °C

Cada reacción se realizó mezclando 2.8 µl de primers (1.4 µl de Fw y 1.4 µl de Rv a 20 ng/µl), 5 µl de buffer (10x), 8 µl de dNTPs (10mM), 6 µl de MgCl (25mM), 0.5 µl de taq polimerasa y 3 µl de ADN (600 ng/ µl) en un tubo para PCR. El volumen final se ajustó a 50 µl.

### Purificación de los productos de la PCR

La purificación de los productos de la PCR se realizó mediante el Kit QIAquick, a partir de los 100 µl obtenidos de la PCR. Para ello se adicionaron 500 µl de Buffer PB a cada muestra mezclado por inversión. El contenido del tubo se hizo pasar a través de una columna y se centrifugó a 13000 rpm durante 1 minuto. Se descargó el contenido del tubo colector y la columna se colocó nuevamente en el mismo tubo. Para lavar se adicionaron 750 µl de Buffer PE al centro de la columna y se centrifugó nuevamente a 13000 rpm durante 1 minuto. El contenido del tubo colector se descargó y la columna se volvió a centrifugar (sin adicionar nada) a 13000 rpm durante 1 minuto. La columna se pasó a un tubo eppendor nuevo de 1.5 ml. Para eluir el ADN se adicionaron 50 µl de agua ACCU a 65°C en el centro de la membrana de la columna y se dejó reposar durante 1 minuto. Pasado este tiempo se centrifugó a 13000 rpm durante 1 min. Las muestras fueron cuantificadas mediante un espectrofotómetro NanoDrop 2000 de la marca Thermo Scientific. Para observar la integridad del ADN se corrieron 200 ng de ADN en un gel de agarosa al 2%, adicionando un volumen de buffer de carga por cada 5 volúmenes de ADN purificado.

## Secuenciación

El fragmento de la región de interés se secuenció a partir de los productos purificados de la PCR mediante secuenciación automática en el secuenciador 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems).

Este método consiste en el uso de la ADN polimerasa para sintetizar cadenas con una terminación específica. El fragmento de interés es amplificado a diferentes longitudes al implementar el uso adicional de dideoxinucleótidos (ddNTP) como materia prima. Los dideoxinucleótidos son nucleótidos que no poseen el grupo hidroxilo característico de los dinucleótidos (dNTP) en su extremo 3', por lo que al insertarse en una cadena creciente de ADN impedirán su extensión al no permitir la unión con el grupo fosfato del nucleótido siguiente. Los ddNTP usados en una reacción de secuenciación están marcados por distintos fluoruros, originando un marcaje específico para los 4 nucleótidos presentes en el ADN. La inserción de ddNTP en la reacción es al azar, por lo que al final de ésta se obtendrán varias cadenas de distintas longitudes terminadas por un ddNTP marcado (Sanger *et al*, 1977). Para un análisis de secuenciación automática se realiza una reacción en un tubo que contiene una mezcla de los nucleótidos normales (dNTP) y sus terminadores (ddNTP) marcados por fluoróforos. Posteriormente se realiza una electroforesis capilar que permite la separación de las moléculas de acuerdo a su tamaño. El equipo hace incidir un láser sobre cada banda, emitiendo una señal que es captada y procesada por una computadora.

La información obtenida por el secuenciador se guarda en archivos binarios que incluyen los datos crudos leídos por el secuenciador, los resultados de la electroforesis y la secuencia de nucleótidos con sus respectivas calidades. Esta información fue visualizada mediante el software Fich TV a manera de graficas llamadas electroferogramas. Los electroferogramas representan a los nucleótidos secuenciados en el eje de las X, con sus respectivas curvas de fluorescencia en el eje de las Y (Fig. 7).

El análisis consistió en la identificación visual del sitio en el que se encontraba la delección. En muestras de individuos homocigotos normales se observaron dos curvas de fluorescencia perfectamente empalmadas correspondientes a la lectura de los dos alelos de un gen, mientras que en muestras de personas con una delección en estado heterocigoto se observó el corrimiento de una curva a partir del nucleótido donde se produjo la mutación.

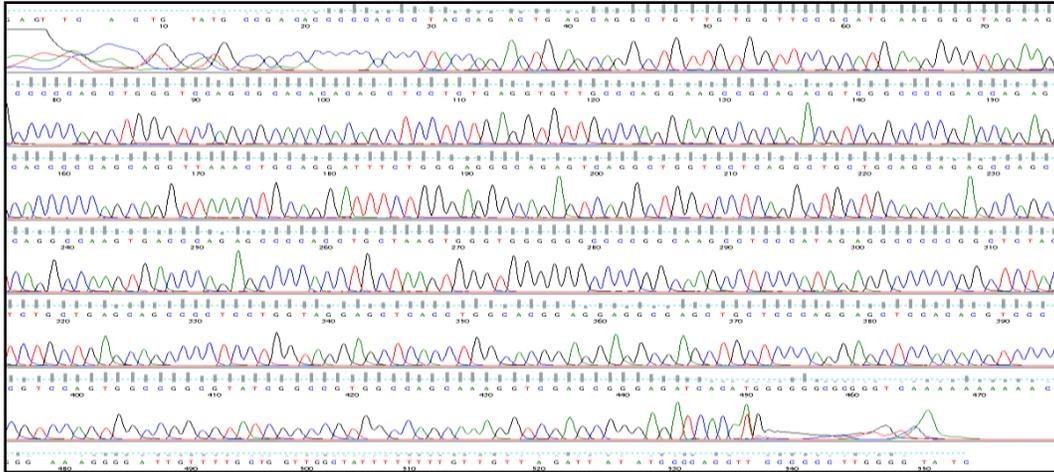


Figura 7. Electroferograma resultante del proceso de secuenciación.

### 7.3 Origen ancestral

Para conocer el origen ancestral de la mutación se realizó el análisis de ancestría global y local a cuatro miembros de la familia del caso tres (padre portador (620), madre portadora (621), hija portadora (622) e hijo normal (626)) (Fig. 8), así como a dos individuos portadores de la mutación de las comunidades restantes (53 y 567) mediante el microarreglo SNP 6.0 de la plataforma Affymetrix.

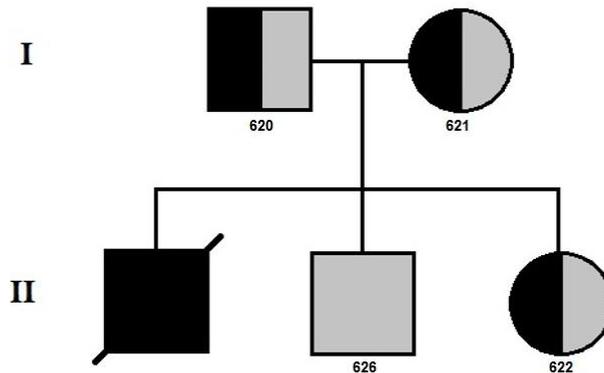


Figura 8. Familia índice del caso 3 con EP: Padre (620), madre (621) e hija (622) portadores de la mutación en estado heterocigoto; hijo (626) homocigoto normal.

#### 7.3.1 Procesamiento de las muestras

El procesamiento del microarreglo se realizó en la unidad de alta tecnología del Instituto Nacional de Medicina Genómica. Para cada microarreglo se hicieron hibridar 25 µl de ADN genómico a una concentración de 70 ng/µl en el array 6.0 de Affymetrix que cuenta con cerca

de 900,000 sondas.

Del procesamiento del microarreglo se obtuvieron como resultado archivos que contaban con la información de los individuos analizados, así como los SNP genotipificados por el microarreglo con sus respectivas frecuencias alélicas y posiciones físicas. A partir de esta información se realizó el análisis de ancestría mediante el uso de distintos softwares.

### **7.3.2 Ancestría global**

El análisis de ancestría global se realizó mediante el software ADMIXTURE, utilizando como poblaciones de referencia datos de 474 individuos nativos americanos (55 totonacas, 85 nahuas, 50 zapotecos y 88 mayas), datos de 112 individuos europeos y datos de 113 individuos africanos, (YRI). La información de las poblaciones indígenas se obtuvo a partir de microarreglos de genotipificación, mientras que la información de la población europea y africana se obtuvo de la base de datos del proyecto HapMap.

Como primer paso se filtró la información mediante el software PLINK. Se partió del archivo original que contenía 898723 marcadores. A este archivo se le extrajeron los marcadores de los cromosomas autosómicos así como los marcadores compartidos por las tres poblaciones de referencia y se le aplicaron los filtros  $r^2$  de 0.1, que se encarga de excluir a los SNP con más del 10% de información perdida, y  $maf$  de 0.05 que se encarga de excluir a aquellos SNP cuya frecuencia alélica sea menor al 5%. El archivo resultante se juntó con las poblaciones de referencia y se corrió en el software ADMIXTURE utilizando un valor de corrida de  $K$  de 3 a 10, donde  $K$  es el parámetro que indica el número de componentes ancestrales a calcular. Se eligió el resultado cuya  $K$  exhibiera un menor error de validación ( $cv$ ), ya que este parámetro indica un mejor modelo de predicción para la corrida y permite la detección de los componentes que mejor describen a las poblaciones utilizadas en el análisis.

Este mismo análisis se realizó para el cromosoma 17, debido a que es en este cromosoma donde se encuentra la mutación. Para ello se extrajeron los marcadores correspondientes al cromosoma 17 a partir del archivo generado en el paso anterior. El análisis se corrió en ADMIXTURE utilizando valores de  $K$  de 3 a 10.

Adicionalmente se realizó el análisis de componentes principales (PCA) mediante el software PLINK. Para ello se establecieron las relaciones IBD (probabilidad de compartir dos alelos iguales por descendencias) entre todos los individuos del archivo. Las relaciones IBD establecen el grado de parentesco entre individuos permitiendo la generación de coeficientes

de parentesco entre ellos (PLINK (1.07), 2010). Mediante estos coeficientes de parentesco se generaron cuatro grupos de datos correspondientes a los cuatro principales componentes de variabilidad detectados por el programa. Estos datos fueron graficados en R en combinación de dos clusters (C1 vs C2, C2 vs C3, C1 vs C3) permitiendo la visualización de cada individuo en un espacio de dos dimensiones y su asignación a un grupo de datos. Este análisis se realizó para todo el genoma así como para el cromosoma 17.

### **7.3.3 Ancestría local**

El análisis de ancestría local para el cromosoma 17 se realizó mediante el software PCAdmix. PCAdmix utiliza un algoritmo que estima la ancestría local mediante un análisis de componentes principales (PCA) a partir de la información de poblaciones de referencia faseadas. Los archivos de referencia faseados se obtuvieron a partir de tríos (padre, madre e hijo) de individuos de la misma base de datos con la que se estimó la ancestría global (CEU, YRI y NAT), mientras que los datos del archivo POMPE fueron faseados mediante el software BEAGLE. A estos archivos faseados se les extrajeron los marcadores correspondientes al cromosoma 17 y se corrieron en PCAdmix generando el análisis de todo el cromosoma en ventanas de SNP de una megabase.

La presencia del haplotipo se determinó a partir de los resultados de los archivos faseados. Para ello se compararon los marcadores cercanos a la mutación de cada uno de los cromosomas de los individuos sanos y portadores. El bloque formado por los marcadores compartidos por los individuos afectados se estableció como el nuevo haplotipo.

Finalmente, para determinar subcomponente ancestral de la mutación se extrajeron los SNP de la ventana que contenía la mutación, así como los SNP del haplotipo y se analizaron mediante el software STRUCTURE con una K=6.

## **8. RESULTADOS**

### **8. 1 Prevalencia**

Los parámetros 260/280 y 260/230 permitieron determinar una calidad adecuada de las muestras para la realización del análisis de genotipificación (Fig. 9).

Los productos de purificación de la PCR presentaron el tamaño esperado de 493 pb correspondientes a la secuencia amplificada por los oligonucleótidos diseñados. Las muestras

presentaron una degradación mínima después de ser purificadas (Fig.10).

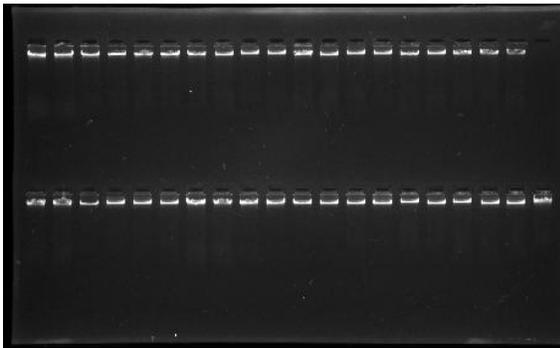


Figura 9. Gel de integridad de ADN

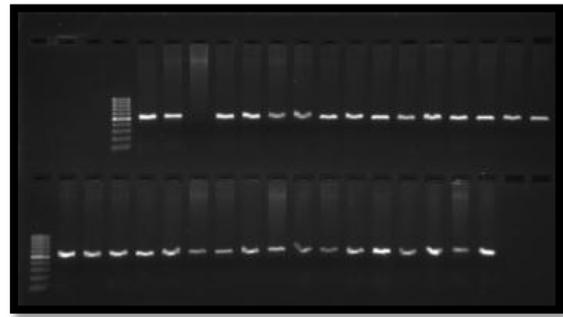


Figura 10. Gel de los productos purificados de la PCR de una secuencia del gen GAA

En cuanto a los resultados de prevalencia se determinó mediante el análisis de las curvas de fusión que de los 352 individuos estudiados para la zona Huasteca, 31 de ellos presentaron la mutación en estado heterocigoto, 331 no presentaron la mutación; y ningún individuo presentó la mutación en estado homocigoto.

En los 100 sujetos estudiados de las poblaciones de San Luis Potosí y Morelos, no se encontró ninguno portador de la mutación.

Estos resultados fueron validados mediante secuenciación automática en los 31 individuos que resultaron heterocigotos para la mutación, así como en los 80 individuos normales cuyas muestras presentaron mayor calidad. El análisis de los electroferogramas mostró una doble lectura desfasada en los individuos heterocigotos. Una de las lecturas corresponde a las señales detectadas en el alelo normal, mientras que la otra lectura corresponde al corrimiento de señal a partir del nucleótido 350, donde se produce la mutación (Fig. 11). El análisis correspondiente a los individuos normales mostró la misma lectura para ambos alelos (Fig. 12). Estos resultados concuerdan con los resultados de genotipificación obtenidos a partir del análisis de las curvas de fusión.

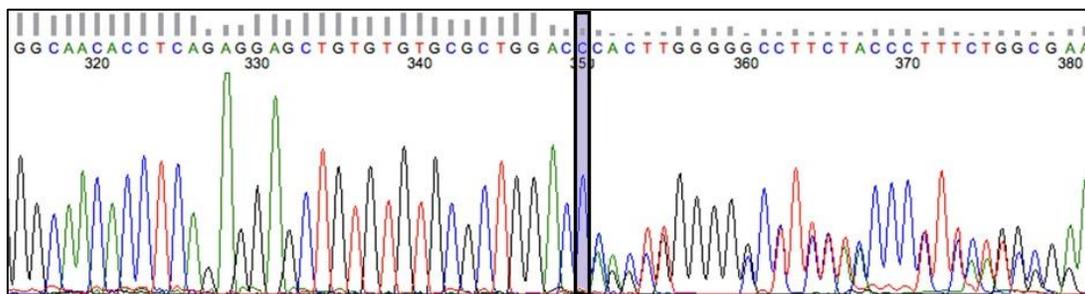


Figura 11. Electroferograma de un individuo heterocigoto. Corrimiento de la lectura a partir del nucleótido

350.

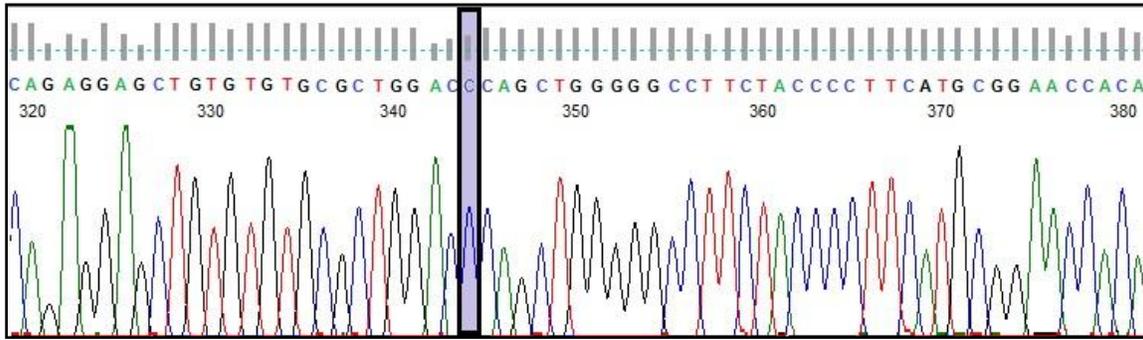


Figura 12. Electroferograma de un individuo normal

La población de Papatlaco presentó una prevalencia de 5.23% para portadores de la mutación en estado heterocigoto, correspondiente a 10 de los 191 individuos estudiados. En Emiliano Zapata, donde acudió al estudio la mayor parte de la población, presentó una prevalencia de 12.06%, correspondiente a 14 de los 102 individuos estudiados. Para Tetlalpan no fue posible determinar la prevalencia de portadores, debido a que la mayor parte de los participantes son familiares de primer y segundo grado del caso índice, por lo que únicamente reportamos 7 portadores en los 46 individuos estudiados.

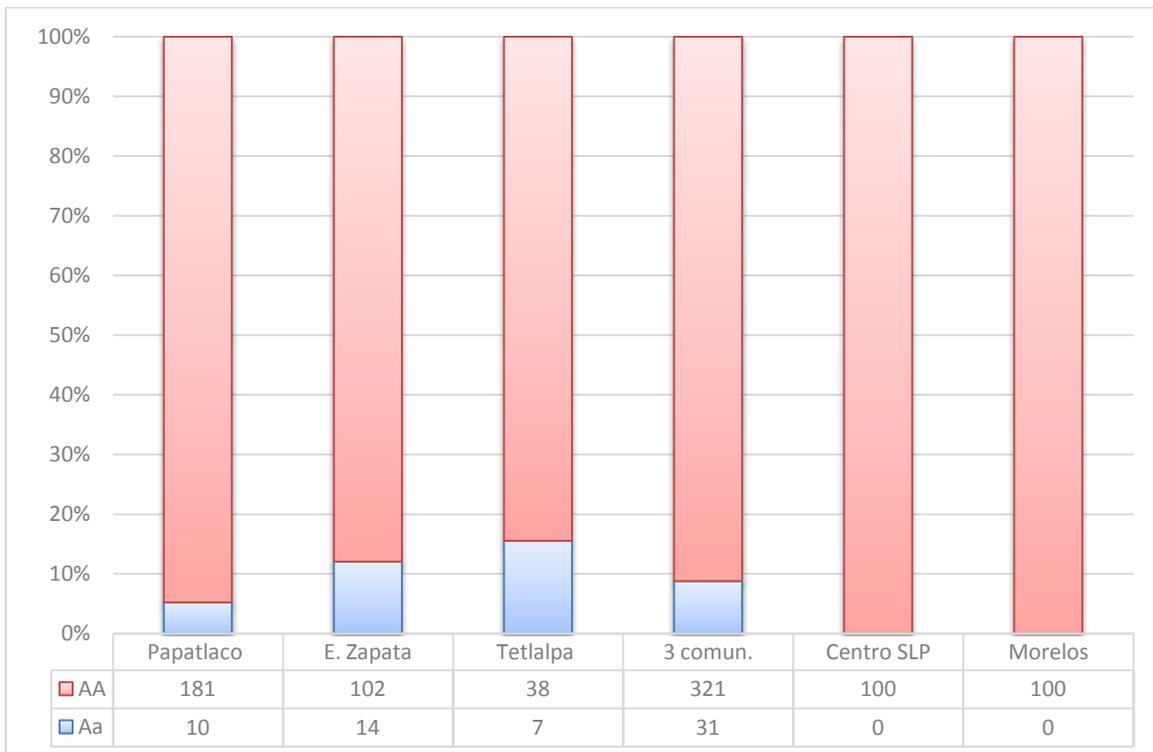


Figura 13. Prevalencia de portadores de la mutación c.1987delC en comunidades de la Huasteca de México

## 8.2 Origen ancestral

Las muestras con las que se realizó el microarreglo presentaron una calidad adecuada. Se observó muy poca degradación del ADN y los valores de parámetros 260/280 y 260/230 se encontraron dentro del rango de calidad establecido.

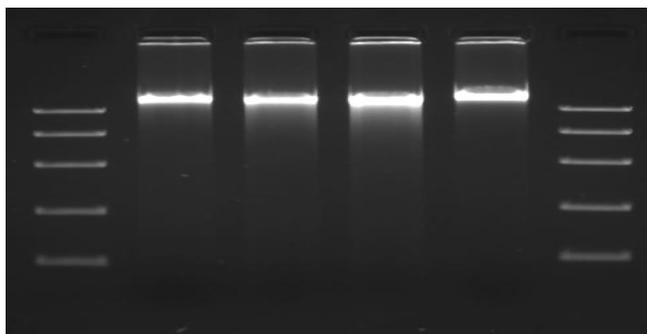


Figura 14. Gel de integridad de ADN de los cuatro individuos de la familia del caso tres con EP.

Tabla 1. Diluciones y calidades de las muestras con las que se realizó el microarreglo.

Muestra	Conc. ADN	260/280	260/230
620	68.7	1.82	2.3
621	72.4	1.78	2.35
622	74.6	1.79	2.14
626	69.3	1.81	2.37
53	70.8	1.88	2.2
567	71.5	1.81	2.03

### 8.2.1 Ancestría global

Para el análisis de ancestría global a partir del filtrado de datos del archivo original que contaba con 898,723 SNPs se obtuvo un archivo final con 325,627 SNP compartidos por las tres poblaciones de referencia. Únicamente se incluyeron los SNP que estuvieran presentes en más del 90% de los individuos y los errores mendelianos fueron corregidos en los 4 individuos de la familia del caso tres.

A partir de este archivo se calcularon las relaciones IBD (probabilidad de compartir alelos por descendencia) con lo cual se generó un coeficiente de parentesco entre los individuos estudiados. Este coeficiente de parentesco se refiere a la fracción de alelos idénticos por descendencia (IBD) que comparten dos individuos. Este coeficiente se calculó para cero (Z0), uno (Z1) y dos (Z2) alelos IBD, donde Z0 se refiere a la proporción de veces en la que dos individuos no comparten alelos IBD, Z1 se refiere a la proporción de veces en la que estos individuos comparten un alelo IBD y Z2 a la proporción de veces en que los dos individuos

comparten dos alelos IBD (Hedrick, 2010). Las relaciones de parentesco más fuertes se observaron en la familia del caso tres. Entre los padres e hijos se muestra un coeficiente de parentesco mayor al 0.50 ya que el 50% de los genes que poseen los hijos son heredados del padre y el otro 50% son heredados de la madre. El padre y la madre presentan 23% de alelos IBD mostrando un coeficiente de parentesco muy similar al esperado teóricamente entre medios hermanos, dobles primos hermanos, tío y sobrino, abuelo y nieto ( $r=0.25$ , 25%) (Hill WG, 1993). Esta proporción de alelos IBD se conserva entre los individuos de las tres comunidades lo que nos permite sugerir un alto grado de parentesco entre los individuos de las tres comunidades.

Tabla 2. Relaciones de parentesco entre los individuos estudiados. Se muestra la probabilidad de compartir 0, 1 o 2 alelos por descendencia (Z0, Z1, Z2).

FID1	IID1	FID2	IID2	EZ	Z0	Z1	Z2	PI_HAT	PHE	DST	PPC	RATIO
F1	620B	F1	621B	0	0.7684	0	0.2316	0.2316	1	0.730413	0	1.7488
F1	620B	F1	622B	0.5	0	0.7893	0.2107	0.6054	1	0.834684	1	NA
F1	620B	F1	626B	0.5	0	0.7896	0.2104	0.6052	0	0.83461	1	NA
F1	620B	F3	567	NA	0.7294	0.0558	0.2148	0.2427	1	0.741498	0.9633	2.1227
F1	620B	F2	53	NA	0.7745	0	0.2255	0.2255	1	0.735531	0.0855	1.912
F1	621B	F1	622B	0.5	0	0.8064	0.1936	0.5968	1	0.831088	1	NA
F1	621B	F1	626B	0.5	0	0.8064	0.1936	0.5968	0	0.831105	1	NA
F1	621B	F3	567	NA	0.717	0.0658	0.2172	0.2501	1	0.743582	0.9945	2.1774
F1	621B	F2	53	NA	0.7734	0	0.2266	0.2266	1	0.734422	0.3257	1.9704
F1	622B	F1	626B	0.5	0.2709	0.2771	0.452	0.5905	0	0.850286	1	8.0993
F1	622B	F3	567	NA	0.6706	0.1168	0.2127	0.271	1	0.748621	1	2.3445
F1	622B	F2	53	NA	0.7663	0.0018	0.2319	0.2328	1	0.740308	0.4043	1.9841
F1	626B	F3	567	NA	0.6993	0.0886	0.2121	0.2564	0	0.744815	0.9999	2.2706
F1	626B	F2	53	NA	0.7714	0	0.2286	0.2286	0	0.737893	0.7164	2.0382
F3	567	F2	53	NA	0.4936	0.3646	0.1418	0.3241	1	0.756608	1	3.0183

Las relaciones IBD establecidas entre las poblaciones de referencia y los individuos estudiados permitieron determinar la ancestría global mediante un análisis de componentes principales. Los individuos estudiados se agruparon dentro de las poblaciones de referencia nativas. En los tres componentes de variabilidad detectados por el programa los individuos se ubican dentro del cluster de las poblaciones nativas, indicando un alto número de variantes genéticas compartidas por estas poblaciones (Fig.15).

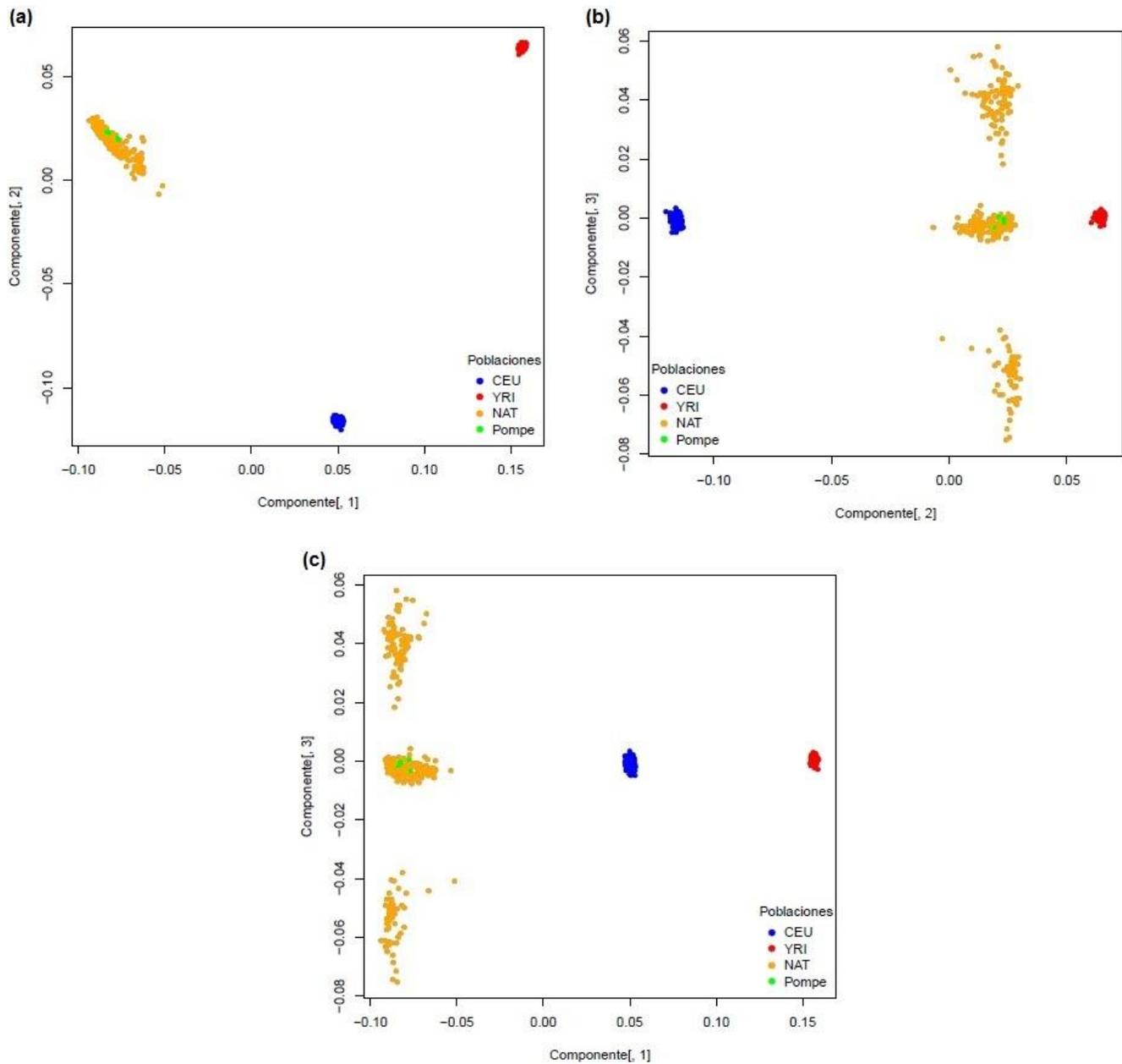


Figura 15. PCA con datos de ancestría de las poblaciones NAT, CEU y YRI. a) componente 1 vs componente 2. b) componente 1 vs componente 3. c) componente 2 vs componente 3).

El análisis de ancestría global realizado en ADMIXTURE con una K=3 determinó que más del 95% de todo el genoma de los individuos estudiados correspondía a un componente genético indígena, mientras que el 5% restante correspondía a los componentes ancestrales europeo y africano (Fig. 18, tabla 3).

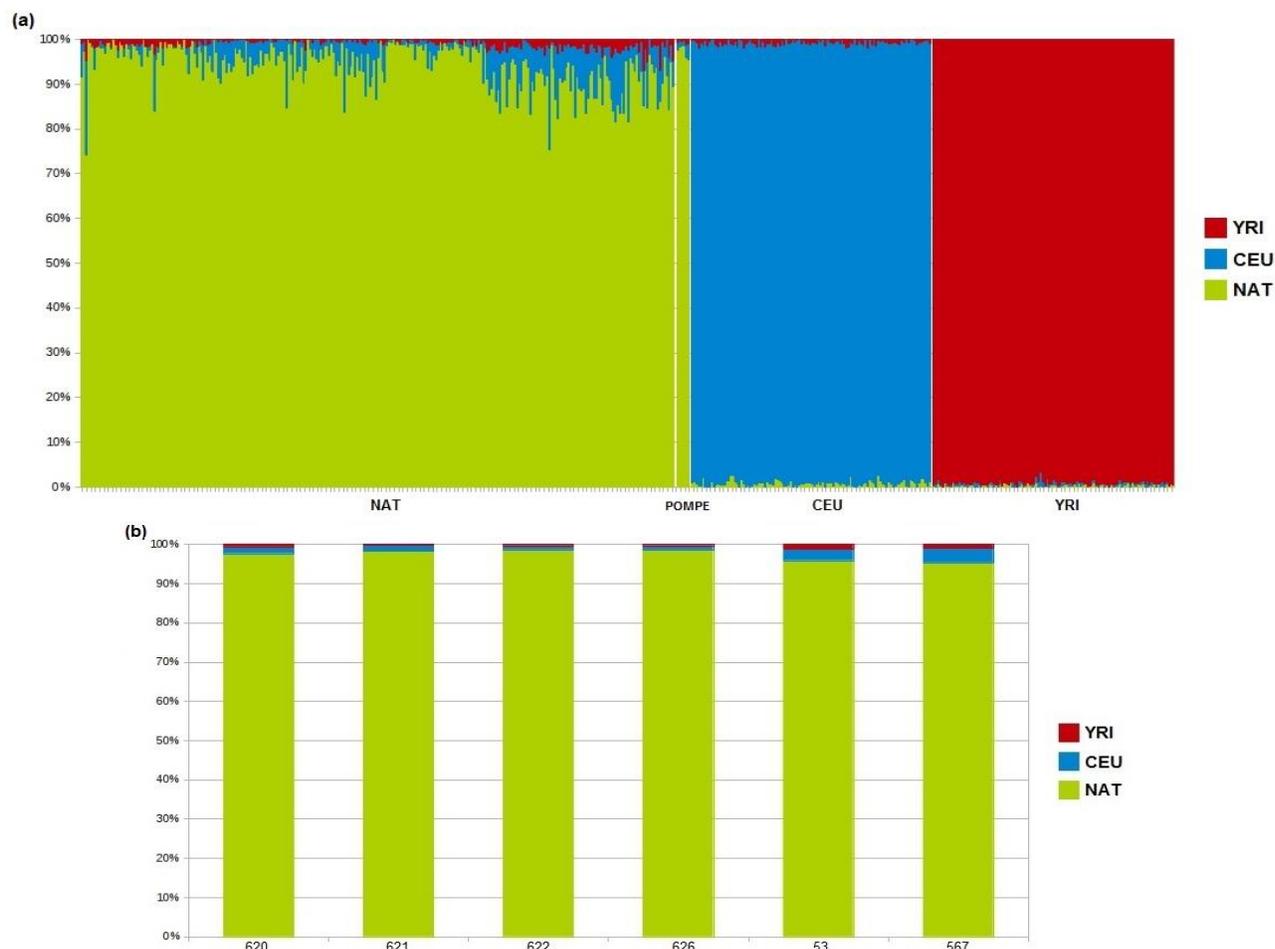


Figura 16. Análisis de ancestría global realizado en ADMIXTURE con una K=3. a) Componente ancestral de las poblaciones de referencia (NAT, CEU y YRI) y de los individuos analizados. Componente ancestral nativo se muestra en color verde, componente europeo en color azul y componente ancestral africano en color rojo. b) Proporción de los diferentes componentes ancestrales de los individuos estudiados. Individuos 620, 621, 622 y 626 corresponden a la familia del caso tres (Papatlaco), individuos 53 y 567 corresponden a individuos de las comunidades de Emiliano Zapata y Tetlalpan respectivamente.

Tabla 3. Proporción de los componentes ancestrales de todo el genoma de los individuos analizados. (K=3)

	NAT	CEU	YRI
<b>620</b>	0.976665	0.016966	0.006369
<b>621</b>	0.983023	0.015727	0.00125
<b>622</b>	0.986257	0.010299	0.003444
<b>626</b>	0.985921	0.011052	0.003028
<b>53</b>	0.959046	0.028915	0.012039
<b>567</b>	0.953531	0.036011	0.010458

El análisis de componentes principales realizado con la información de las poblaciones nativas detecto una alta similitud genética entre los individuos estudiados y los individuos de las poblaciones maya y zapoteca. Los componentes de variabilidad 1 y 3, que fueron los que lograron diferenciar con mayor precisión a las poblaciones de referencia, agruparon a los individuos estudiados entre los clusters de las poblaciones maya y zapoteca, mostrando mayor cercanía con esta última (Fig. 17).

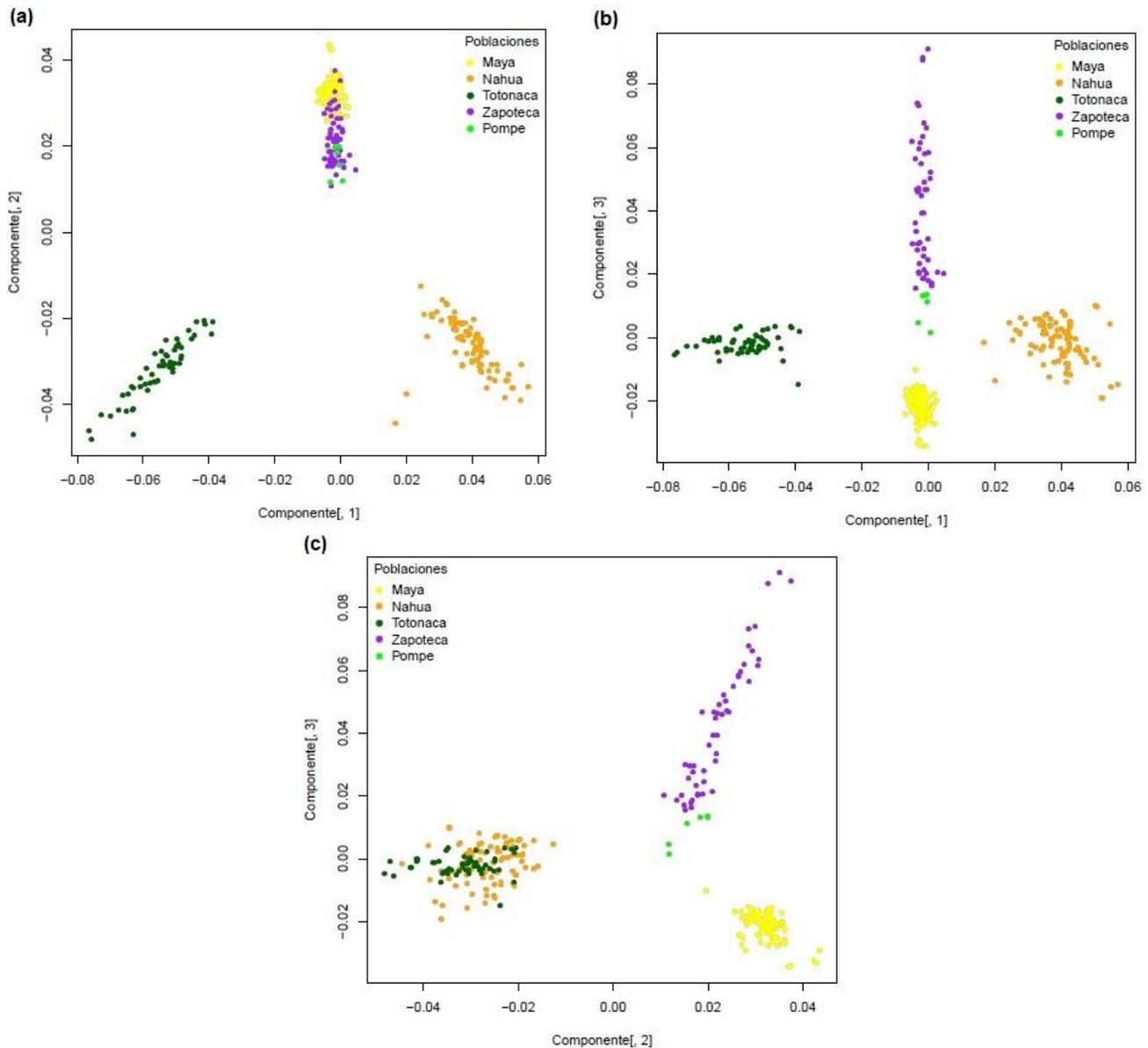
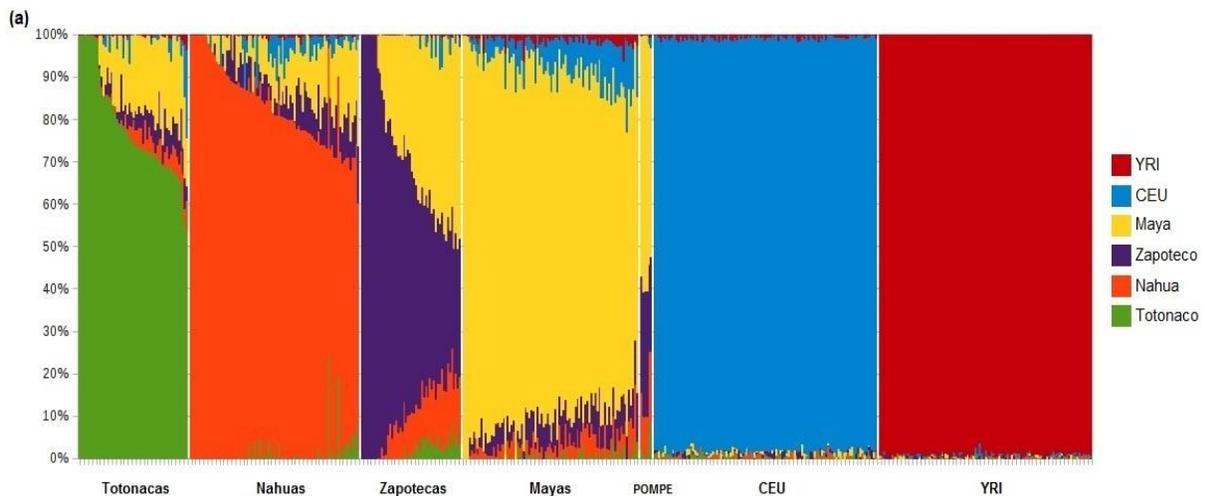


Figura 17. PCA de las variantes genéticas de poblaciones nativas: maya en amarillo, nahua en anaranjado, totonaca en verde, zapoteca en morado. a) componente 1 vs componente 2. b) componente 1 vs componente 3. c) componente 2 vs componente 3).

La subestructura de los individuos se determinó mediante ADMIXTURE. La K que más se ajustó al análisis fue de 6, indicando la presencia de subcomponentes poblacionales dentro de las poblaciones de referencia. En las poblaciones de referencia CEU y YRI se detecta un único componente ancestral: en color azul el componente ancestral europeo y en color rojo el componente ancestral africano. En la población NAT se identifican 4 subcomponentes ancestrales correspondientes a los 4 grupos étnicos que incluyen la población de referencia NAT: totonacas en color verde, nahuas en color anaranjado, zapotecos en color morado y mayas en color amarillo (Fig. 18a). Los individuos estudiados presentan mayor proporción del componente maya (aproximadamente 50%), seguido del componente zapoteco (aproximadamente 25%). Los componentes nahua y totonaca se observan en menor proporción en la familia del caso tres, mientras que en los individuos 53 y 567 la proporción del componente nahua es muy cercana a la proporción del componente zapoteco (Fig. 18b, tabla 4).

El resultado de la subestructura poblacional generado por el análisis de componentes principales (PCA) difiere con respecto al resultado generado por ADMIXTURE, ya que el primero mide la variabilidad genética detectada entre los individuos, mientras que el segundo calcula la proporción de cierto número de componentes ancestrales en las diferentes poblaciones analizadas.

En el análisis generado por ADMIXTURE se puede observar un mayor mestizaje en los individuos zapotecos, que comparten una proporción considerable del componente ancestral maya. El flujo génico entre estas poblaciones es mayor que con respecto a las poblaciones nahua y totonaca, hecho por el cual puede explicarse que en el análisis de componentes principales existe mayor cercanía entre estas poblaciones, así como en los individuos afectados.



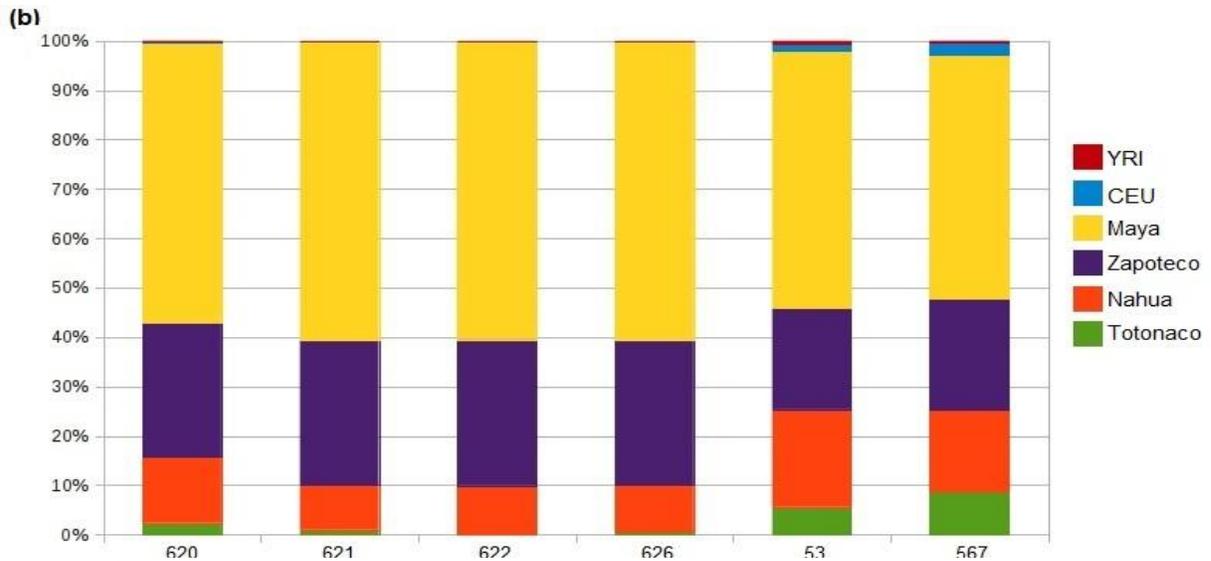


Figura 18. Subestructura poblacional de los individuos estudiados. Análisis realizado con ADMIXTURE con una K=6. a) Mapa de la subestructura poblacional de las poblaciones de referencia. b) Proporción de los diferentes componentes ancestrales de los individuos estudiados.

Tabla 4. Proporción de los componentes ancestrales de todo el genoma de los individuos analizados. (K=6)

	<b>Totonaca</b>	<b>Nahua</b>	<b>Zapoteco</b>	<b>Maya</b>	<b>CEU</b>	<b>YRI</b>
<b>620</b>	0.023603	0.133218	0.27321	0.566679	0.002204	0.001086
<b>621</b>	0.009307	0.090727	0.292942	0.607003	0.00001	0.00001
<b>622</b>	0.00001	0.099064	0.29637	0.604535	0.00001	0.00001
<b>626</b>	0.006035	0.093826	0.29483	0.605288	0.00001	0.00001
<b>53</b>	0.055743	0.197591	0.204861	0.521177	0.014157	0.006471
<b>567</b>	0.086922	0.165991	0.224934	0.493343	0.023871	0.004939

El análisis de componentes principales para el cromosoma 17 detecto mayor similitud entre los individuos estudiados y los individuos de las poblaciones maya y zapoteca. Las poblaciones de referencia se agrupan más homogéneamente ya que la densidad de los SNP disminuyó considerablemente (Fig. 19).

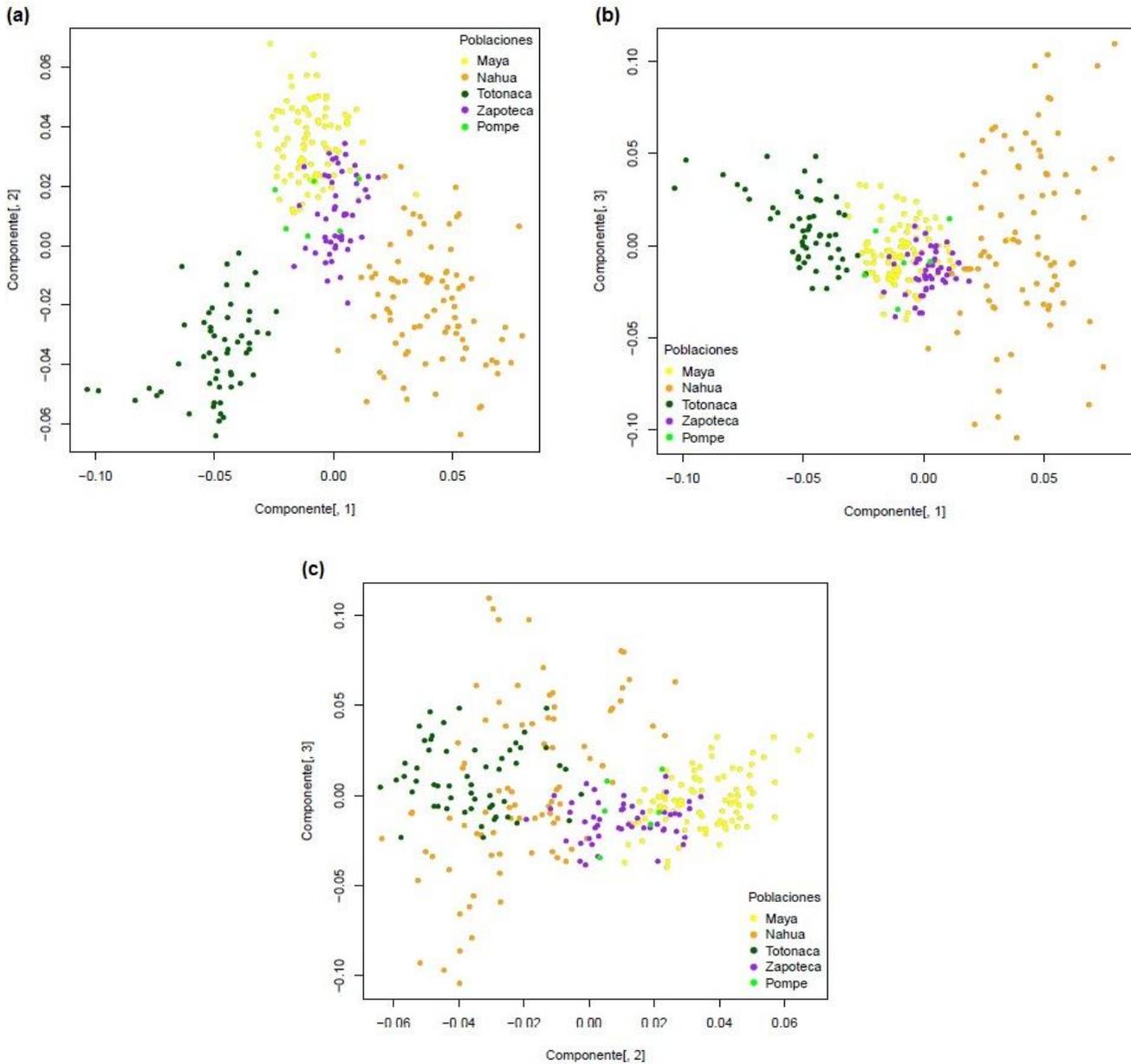


Figura 19. PCA de las variantes genéticas del cromosoma 17 en poblaciones nativas: maya en amarillo, nahua en anaranjado, totonaca en verde, zapoteca en morado. a) componente 1 vs componente 2. b) componente 1 vs componente 3. c) componente 2 vs componente 3).

En cuanto al análisis de ancestría del cromosoma 17 la K que más se ajusto fue de 5, formando un componente compartido por las poblaciones maya y zapoteca (Fig. 20a). Este resultado permite identificar un componente particular de las poblaciones del sureste del país. Los individuos analizados presentan una mayor proporción de este componente (80% en promedio) (Fig. 20b, tabla 5).

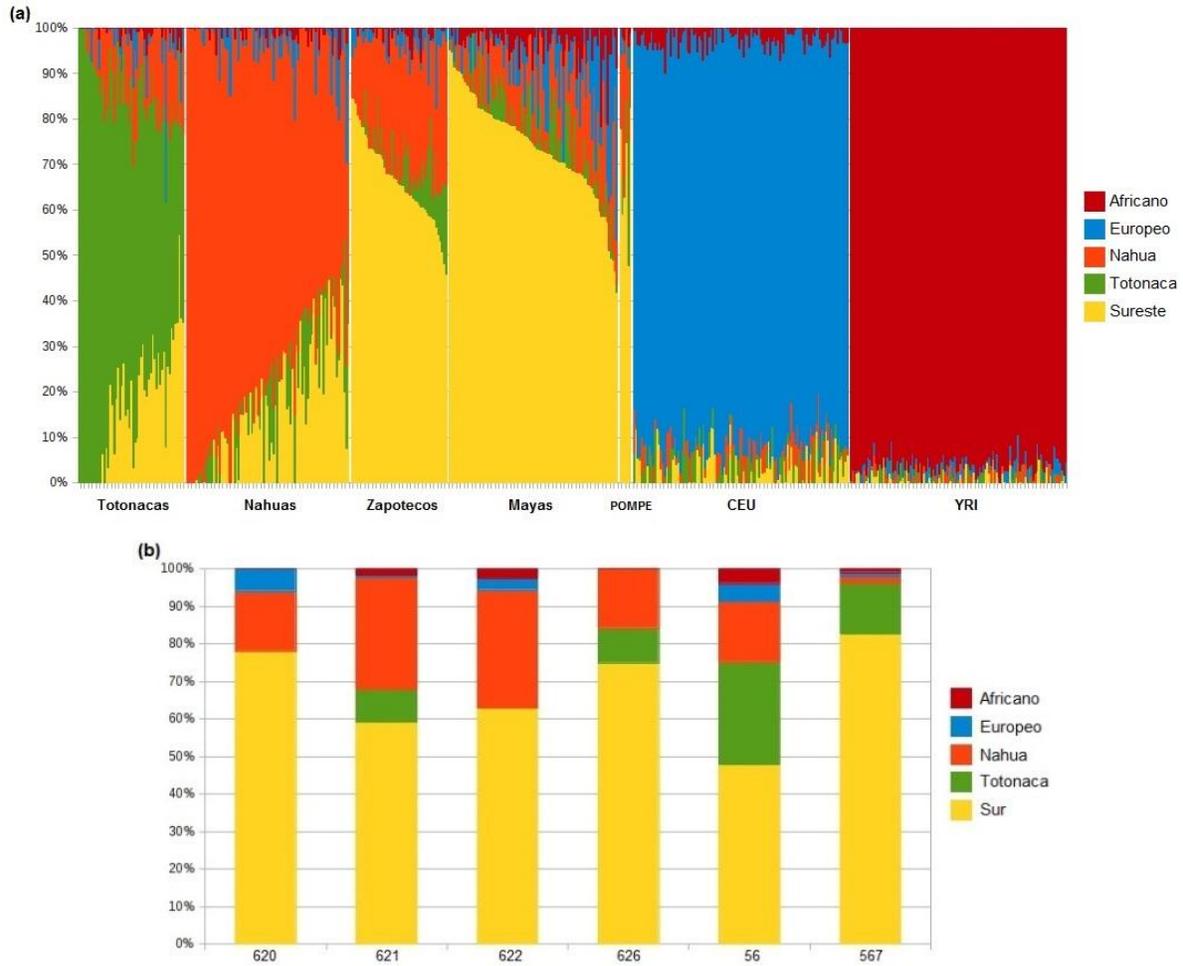


Figura 20. Subestructura poblacional del cromosoma 17 de los individuos estudiados. Análisis realizado con ADMIXTURE con una K=5. A) Mapa de la subestructura poblacional de las poblaciones de referencia. B) Proporción de los diferentes componentes ancestrales de los individuos estudiados

Tabla 5. Proporción de los componentes ancestrales del cromosoma 17 de los individuos analizados. (K=5)

	<b>Sureste</b>	<b>Centro</b>	<b>Norte</b>	<b>Europeo</b>	<b>Africano</b>
<b>620</b>	0.779598	0.000728	0.159705	0.059959	0.00001
<b>621</b>	0.590136	0.087618	0.2988	0.005222	0.018225
<b>622</b>	0.62872	0.000096	0.314669	0.029066	0.02745
<b>626</b>	0.748618	0.092618	0.158131	0.000623	0.00001
<b>53</b>	0.477916	0.273165	0.161389	0.04799	0.03954
<b>567</b>	0.82609	0.135118	0.018768	0.009643	0.01038

### 8.2.1 Ancestría local

Para conocer el origen ancestral del cromosoma 17 y de la mutación se realizó el análisis de ancestría local. Se extrajeron los SNP del cromosoma 17 a partir del archivo filtrado con el que

se realizó el análisis de ancestría global y se obtuvo un nuevo archivo con 8,596 SNP. Este archivo se fragmento en 76 ventanas de 1 megabase de tamaño. Los SNP correspondientes a la mutación se distribuyeron entre las ventanas 73 y 74, mientras que la mutación se distribuyó al inicio de la ventana 74 en la posición 80112973 (GRCh38.p2). La ancestría estimada para esas ventanas fue nativa con un 99% de confianza (tabla 5).

Tabla 6. Ancestría de las ventanas de SNP que incluyen al gen GAA y a la mutación causante de EP

	Ancestría	Confianza
<b>Ventana 73</b>	NAT	0.999942
<b>Ventana 74</b>	NAT	0.999881

En uno de los cromosomas del padre (620) y del hijo (626) de la familia del caso tres se identificaron dos ventanas de ancestría europea y dos ventanas de ancestría africana, mientras que las ventanas restantes de dicho cromosoma presentaron ancestría nativa. En los dos cromosomas de la madre (621), de la hija (622) y de los dos individuos restantes (53 y 567) se identificaron ventanas con ancestría nativa (Fig. 21).

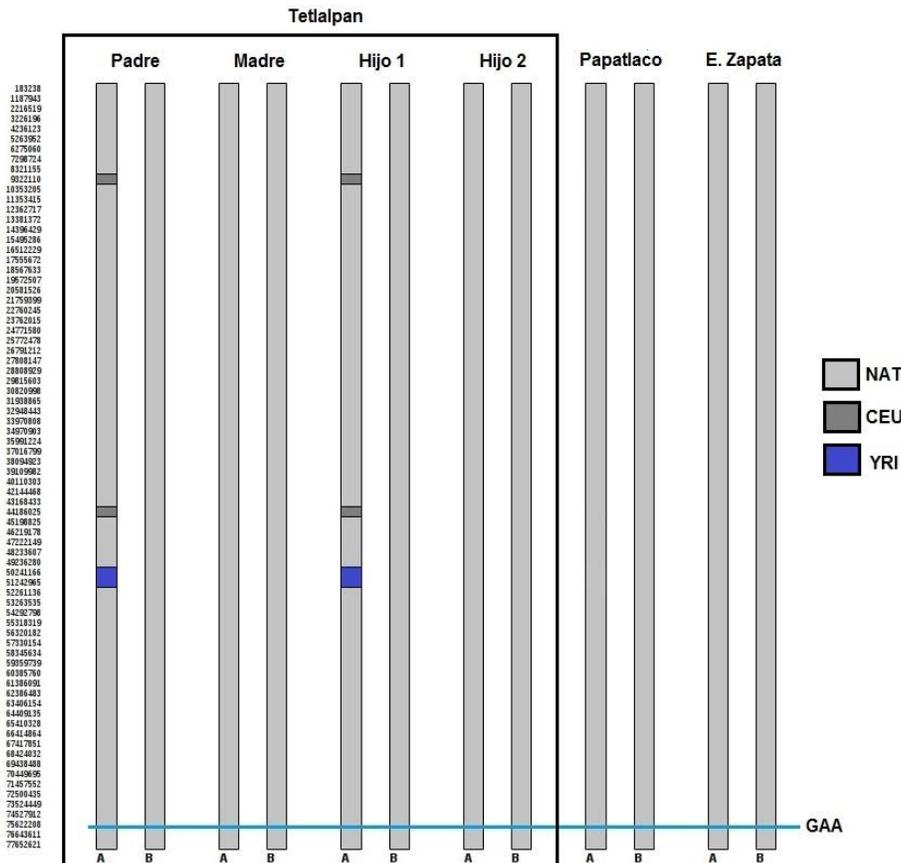


Figura 21. Componentes ancestrales del cromosoma 17 en los individuos estudiados.

En cuanto a la determinación del haplotipo el faseo de los cromosomas muestra un bloque de SNP comunes compartido por todos los cromosomas portadores, sin embargo, una alta proporción de estos SNP se encuentran en estado homocigoto en todos los individuos estudiados dificultando la imputación de un haplotipo totalmente informativo.

La ancestría de la mutación se determinó mediante la inferencia de los componentes ancestrales del bloque de SNP que incluían a la mutación. Los individuos mostraron una alta proporción del componente ancestral maya representando por más del 50% de todo el genoma en promedio (Fig. 22, tabla 7).

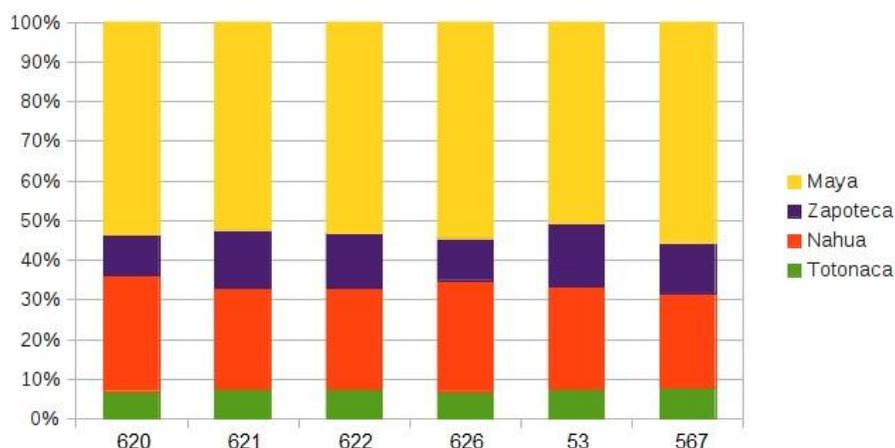


Figura 22. Subestructura poblacional de los SNP circundantes a la mutación.

Tabla 7. Proporción de los componentes ancestrales de los SNP circundantes a la mutación.

	<b>Totonaca</b>	<b>Nahua</b>	<b>Zapoteco</b>	<b>Maya</b>
<b>620</b>	0.069	0.291	0.103	0.536
<b>621</b>	0.073	0.255	0.148	0.524
<b>622</b>	0.074	0.254	0.14	0.532
<b>626</b>	0.068	0.28	0.107	0.545
<b>567</b>	0.073	0.259	0.16	0.507
<b>53</b>	0.077	0.239	0.128	0.557

## 9. ANÁLISIS DE RESULTADOS

En los estudios retrospectivos se observado una mayor frecuencia de consanguinidad de los progenitores de los individuos que tienen una enfermedad o anomalía autosómica recesiva (Cavalli, 1981). En el caso de nuestro estudio, no contamos con datos concretos que permitan calcular el coeficiente de consanguinidad entre los padres de los individuos portadores de la

mutación, sin embargo, las relaciones IBD establecidas en la familia del caso tres muestran un alto grado de parentesco entre los padres del afectado. Así mismo en la población de Papatlaco el 80% de los matrimonios se realizan entre personas que comparten el mismo apellido y más del 20% de la población se reconocen como consanguíneos. Bajo este panorama es de esperarse una alta frecuencia del alelo mutado y una alta probabilidad de tener hijos afectados ya que los efectos genéticos de la consanguinidad se caracterizan por el hecho de que los descendientes de individuos consanguíneos pueden ser homocigotos para una mutación que se encontraba en combinación heterocigótica en el antecesor común (Cavalli, 1981).

De hecho, la prevalencia de portadores de la mutación en las comunidades de Papatlaco y Emiliano Zapata es del 8.5%, evidenciando un alto riesgo de nacimientos de individuos con EP si los pobladores de dichas comunidades siguen reproduciéndose entre sí. Estos datos justifican un programa de tamizaje para los recién nacidos de dichas comunidades permitiendo la identificación temprana de la enfermedad y con ello un diagnóstico oportuno que amplíe las expectativas de vida en los individuos afectados mediante el tratamiento de remplazo enzimático. No presentamos datos de prevalencia para Tetlalpan ya que acudieron a la toma de muestra mayoritariamente los familiares del caso índice de esta comunidad.

Los individuos de las tres comunidades comparten una proporción de alelos idénticos por descendencia muy similar a la compartida entre individuos consanguíneos como lo son los medios hermanos, tíos y sobrinos, abuelos y nietos (Hill *et al.*, 1993). Este dato apoyado a su vez por la alta frecuencia del alelo portador de una mutación exclusiva de la huasteca del país confirma la endogamia presente entre las tres comunidades y sugiere un ancestro en común de los pobladores actuales de las comunidades

Se identificaron variantes compartidas en los cromosomas portadores de la mutación, sin embargo, el alto grado de variantes monomórficas presentes en todos los individuos estudiados dificulta la visualización de un haplotipo informativo. Se requiere del apoyo de un análisis más fino que facilite la visualización del haplotipo en las regiones que presentan alto grado de homocigosidad permitiendo sustentar con mayor solidez este resultado. A pesar de ello nuestro estudio proporciona resultados que sugieren la presencia de un efecto fundador, como lo son la consanguinidad detectada en las tres comunidades, así como una alta prevalencia de portadores de la mutación en dichas comunidades.

Así mismo se sabe que la que deriva génica es la fuerza evolutiva que actúa con mayor fuerza en poblaciones pequeñas generando la pérdida de variabilidad genética mediante la pérdida o fijación de alelos al azar que son generalmente neutros (Mayr, 1963), por lo que el alto grado de homocigocidad de nuestra población se puede explicar mediante la fijación de alelos de una población que inicialmente presentaba escasa variabilidad genética a causa de un efecto fundador. Así mismo las consecuencias de un efecto fundador no solo resultan en la pérdida o fijación de alelos neutros, sino que también pueden incrementar la frecuencia de alelos raros generando enfermedades genéticas sumamente raras como es el caso de la Enfermedad de Pompe.

Compartir diferentes componentes ancestrales refleja la alta variabilidad genética existente dentro de las poblaciones nativo americanas como el resultado de la historia pre y post colonial de nuestro país. La alta cantidad de variantes genéticas mayas presentes en los individuos estudiados puede explicarse por el hecho de que uno de los grupos étnicos más representativos de la región huasteca conocido como los téenek o huastecos (representando al 21.64 % de la población de indígena (INEGI, 1995)) se originó a partir de una población aislada de mayas que se separó del tronco ancestral protomaya hace aproximadamente cuatro mil años. Este hecho se suscitó a partir de que pueblos hablantes de mixe-zoque migraron a la costa de golfo de México, desplazando a un pequeño grupo de mayas hacia los estados del norte del Istmo de Tehuantepec. Así mismo esta hipótesis se sustenta por el hecho de la única lengua maya existente fuera del territorio maya es hablada por los huastecos que habitan en el norte de Veracruz (Campbell, 1985). Muy probablemente nuestra población de estudio comparte por herencia una alta proporción de las variantes genéticas presentes en las poblaciones mayas ancestrales que dieron origen a los huastecos que poblaron la actual región téenek de la huasteca del país y posiblemente nuestra zona de estudio.

Los individuos estudiados presentaron una baja proporción del componente ancestral nahua a pesar de que se reconocen como hablantes de dicha lengua y se distribuyen en una región geográfica donde predominan las poblaciones nahuas (sureste de San Luis Potosí y norte de Hidalgo) sobre las poblaciones téenek. Dentro de la región huasteca los nahuas constituyen el grupo indígena mayoritario representando al 76.66% de la población de habla indígena (PHLI) (INEGI, 1995). Desde la época prehispánica compartieron el territorio de la huasteca con distintos grupos étnicos como lo son los téenek, otomíes, pames y totonacos, y representan al último grupo indígena que pobló la huasteca prehispánica. Es por esta razón que la región de la huasteca representa en la actualidad un mosaico de diversas culturas y costumbres

representadas por las distintas etnias dentro de las que se reconoce la existencia de relaciones sumamente cercanas (Valle, 2003). La comisión nacional para el desarrollo de los pueblos indígenas reporta la presencia de comunidades con individuos que además de hablar náhuatl hablan una o más de las otras lenguas propias de la región. Bajo estos hechos no es raro encontrar poblaciones que muestren una identidad cultural (lengua, costumbres, tradiciones, etc.) distinta a su identidad genética, tal es el caso de nuestra población de estudio, que a pesar de hablar una lengua náhuatl presenta una mayor proporción de un componente ancestral característico de las poblaciones téenek, mostrando la influencia cultural de los nahuas sobre las demás etnias y evidencia el mestizaje cultural y genético existente las mismas.

La alta proporción de componente zapoteco en los individuos estudiados es reflejo del elevado flujo génico existente entre las poblaciones zapotecas y la mayor parte de las poblaciones del territorio mexicano. Estrada y cols reportan la presencia de un componente ancestral nativo proveniente del sur del país altamente frecuente en todos los estados de la república, alcanzando valores máximos en Oaxaca (estado donde se distribuyen las poblaciones zapotecas) y valores decrecientes hacia el norte del país. En los estados que conforman a la Huasteca del país se detectó una alta proporción de este componente (Moreno *et al.*, 2014).

En el análisis de ancestría del cromosoma 17 no se lograron diferenciar las poblaciones de referencia maya y zapoteca pudiendo explicarse por la alta cantidad de variantes genéticas del cromosoma 17 compartidas por los individuos de ambas poblaciones. Se ha observado que existe alta correlación entre la distribución geográfica de las poblaciones y los componentes ancestrales que presentan (Moreno *et al.*, 2014), por lo que la presencia de un componente ancestral compartido por mayas y zapotecos en los individuos estudiados puede explicarse por la presencia de un componente ancestral característico en las poblaciones del sureste del país.

## **10. CONCLUSIONES**

Existe una alta prevalencia de portadores de la mutación c.1987delC del gen GAA para las poblaciones incluidas en el estudio, lo cual representa un alto riesgo de tener hijos afectados para los habitantes de dichas comunidades. Nuestros datos proporcionan las bases epidemiológicas para justificar un programa preventivo por parte de la Secretaría de Salud del Estado.

La presencia de la alta prevalencia de portadores de la mutación c.1987delC en las tres comunidades sugiere un efecto fundador.

Los individuos estudiados presentan más del 95% del componente ancestral nativo americano, dentro del que se distingue una alta proporción del componente ancestral maya característico de las poblaciones téenek de la huasteca del país.

Se sugiere que la mutación se originó dentro de un segmento de ancestría maya.

## 11. REFERENCIAS

- American Association of Neuromuscular & Electrodiagnostic Medicine. Diagnostic criteria for late onset (childhood and adult) Pompe disease. *Muscle Nerve*. 2009;40(1):149-60.
- Ausems MG, Verbiest J, Hermans MP, Kroos MA, Beemer FA, Wokke JH. Frequency of glycogen storage disease type II in the Netherlands: implications for diagnosis and genetic counselling. *Eur J Hum Genet*. 1999;7(6):713-6.
- Barba-Romero MA, Barrot E, Bautista-Lorite J, Gutiérrez Rivas E, Illa I, Jiménez LM. Guía clínica de la enfermedad de Pompe de inicio tardío. *RevNeurol* 2012; 54: 497-507.
- Becker JA, Vlach J, Raben N, Nagaraju K, Adams EM, Hermans MM, Reuser AJ, Brooks SS, Tiffit CJ, Hirschhorn R, Huie ML, Nicolino M, Plotz PH. The African origin of the common mutation in African American patients with glycogen-storage disease type II. *Am J Hum Genet*. 1998;62:991–4.
- Byrne BJ, Kishnani PS, Case LE, Merlini L, Müller-Felber W, Prasad S, et al. Pompe disease: design, methodology, and early findings from the Pompe Registry. *Mol Genet Metab*. 2011;103(1):1-11.
- Comisión Nacional para el Desarrollo de los Pueblos Indígenas / Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo, “Sistema Nacional de Indicadores sobre la Población Indígena de México”, 2002, con base en *XII Censo General de Población y Vivienda*, México, Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática, 2000.
- Cori, G.T. (1954). Enzymes and glycogen structure in glycogenosis. *Osterr Z Kinderheilkd Kinderfuersorge*.10(1-2), 38-42
- De Duve, C. (1963). The lysosome. *Sci Am*, 208, 64–72.

- Di Rocco, M., Buzzi, D. & Tarò, M. (2007). Glycogen storage disease type II: clinical overview. *Acta Myologica*, 27, 42-44
- Drost MR, Schaart G, van Dijk P, van Capelle CI, van der Vusse GJ, Delhaas T, et al. Both type 1 and type 2a muscle fibers can respond to enzyme therapy in Pompe disease. *Muscle Nerve*. 2008;37(2):251-5.
- Esmer C, Becerra-Becerra R, Peña-Zepeda C, Bravo-Oro A. A novel homozygous mutation at the GAA gene in Mexicans with early-onset Pompe disease. *Acta Myologica* 2013;32:95-99
- Fayssoil A. Cardiomyopathy in Pompe's disease. *Eur J Intern Med* 2008;19:57-59.
- Futerman AH, van Meer G. The cell biology of lysosomal storage disorders. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2004;5(7):554-65.
- Griffin JL. Infantile acid maltase deficiency. I. Muscle fiber destruction after lysosomal rupture. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 1984;45:23–36. [PubMed: 6199885]
- Güngör D, de Vries JM, Hop WC, Reuser AJ, van Doorn PA, van der Ploeg AT, Hagemans ML. Survival and associated factors in 268 adults with Pompe disease prior to treatment with enzyme replacement therapy. *Orphanet J Rare Dis* 2011;6:34.
- Gungor D, de Vries JM, Hop WC, Reuser AJ, van Doorn PA, van der Ploeg AT, Hagemans ML. 2011. Survival and associated factors in 268 adults with Pompe disease prior to treatment with enzyme replacement therapy. *Orphanet J Rare Dis* 6:34.
- Hermans MM, van Leenen D, Kroos MA, Beesley CE, Van Der Ploeg AT, Sakuraba H, Wevers R, Kleijer W, Michelakakis H, Kirk EP, Fletcher J, Bosshard N, Basel-Vanagaite L, Besley G, Reuser AJ. Twenty-two novel mutations in the lysosomal alpha-glucosidase gene (GAA) underscore the genotype-phenotype correlation in glycogen storage disease type II. *Hum Mutat* 2004;23:47–56.
- Hers, H.G. (1963). Alpha-Glucosidase deficiency in generalized glycogen storage disease (Pompe's disease). *Biochem J*, 86, 11–6
- Hill WG. Variation in genetic composition in backcrossing programs. *Journal of Heredity*. 1993;84:212–213
- Hirschhorn R, Reuser AJ. Glycogen storage disease type II: acid alpha-glucosidase (acid maltase) deficiency. In: Scriver CR, Beaudet A, Sly WS, Valle D, editors. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. New York: McGraw-Hill; 2001. p. 3389-420.

- Hoefsloot, L.H., Hoogeveen-Westerveld, M., Reuser, A.J.&Oostra, B.A. (1990) Characterization of the human lysosomal alpha-glucosidase gene; *Biochem. J*, 272, 493-497.
- INEGI. Censo de Población y Vivienda 2010. Principales resultados por localidad (ITER).
- Kishnani PS, Corzo D, Nicolino M, et al. Recombinant human acid [alpha]-glucosidase:major clinical benefits in infantile onset Pompe disease. *Neurology* 2007;68: 99-109.
- Kishnani PS, Howell RR. Pompe disease in infants and children. *J Pediatr.* 2004;144Suppl 2:S35-43.
- Kishnani PS, Steiner RD, Bali D, Berger K, Byrne BJ, Case LE, et al. Pompe disease diagnosis and management guideline. *Genet Med.* 2006;8(5):267-88
- Kishnani, P.S., et al. (2010). Cross-reactive immunologic material status affects treatment outcomes in Pompe disease infants. *Mol Genet Metab*, 99, 26–33.
- Kishnani, P.S., Hwu, W.L., Mandel, H., Nicolino, M., Yong, F. &Corzo, D.A. (2006). Retrospective, Multinational, Multicenter, Study on the Natural History of Infantile-Onset Pompe Disease. *The Journal of Pediatrics*, 148, 671-6
- Kroos, M.A., et al. (2007). Broad spectrum of Pompe disease in patients with the same c.-32-13T>G haplotype. *Neurology*, 68, 110-115.
- L. Campbell, T. Kaufman, *Annu. Rev. Anthropol.* 14, 187–198 (1985).
- L.L.Cavalli-Sforza y W.F.Bodmer. 1981. *Genetica de Poblaciones HUmanas*. Omega. Barcelona. pp. 340-368
- Labrousse P, Chien YH, Pomponio RJ, Keutzer J, Lee NC, Akmaev VR, Scholl T Hwu WL. Genetic heterozygosity and pseudodeficiency in the Pompe disease newborn screening pilot program. *Mol Genet Metab.* 2010;99:379-383.
- Lin CY, Hwang B, Hsiao KJ, Jin YR. Pompe's disease in Chinese and prenatal diagnosis by determination of alpha-glucosidase activity. *J InheritMetabDis.* 1987;10:11–7.
- Martiniuk F, Chen A, Mack A, Arvanitopoulos E, Chen Y, Rom WN, Codd WJ, Hanna B, Alcabes P, Raben N, Plotz P. Carrier frequency for glycogen storage disease type II in New York and estimates of affected individuals born with the disease. *Am J Med Genet.* 1998;79:69–72.

- Martiniuk, F., et al.(1991, noviembre).Identification of a missense mutation in an adult-onset patient with glycogenosis type II expressing only one allele.*DNA Cell Biol*, 10(9), 681-7
- Mayr, Ernst. 1963. *Animal Species and Evolution*. 795 págs. Belknap Press of Harvard University Press.
- Meikle PJ, Hopwood JJ, Clague AE, Carey WF. Prevalence of lysosomal storage disorders. *JAMA*. 1999;281:249–54.
- Moreland RJ, Jin X, Zhang XK, Decker RW, A bee KL, Lee KL, et al. Lysosomal acid alpha-glucosidase consists of four different peptides processed from a single chain precursor. *J Biol Chem*. 2005;280(8): 6780-91.
- Moreno-Estrada A, Gignoux CR, Fernández-López JC, Zakharia F, Sikora M, Contreras A V, et al. The genetics of Mexico recapitulates Native American substructure and affects biomedical traits. *Science*. 2014; 344: 1280–5.
- Müller-Felber W, Horvath R, Gempel K, Podskarbi T, Shin Y, Pongratz D, et al. Late onset Pompe disease: clinical and neurophysiological spectrum of 38 patients including long-term follow-up in 18 patients. *NeuromusculDisord* 2007; 17: 698-706.
- Muraoka T, Murao K, Imachi H, Kikuchi F, Yoshimoto T, Iwama H, et al. Novel mutations in the gene encoding acid  $\alpha$  1,4-glucosidase in a patient with late-onset glycogen storage disease type II (Pompe disease) with impaired intelligence. *Inter Med* 2011; 50: 2987-91.
- Raben N, Plotz P, Byrne BJ. Acid alpha-glucosidase deficiency (glycogenosis type II, Pompe disease). *Curr Mol Med* 2002; 2:145-66.
- Raben N, Takikita S, Pittis MG, Bembi B, Marie SK, Roberts A, et al. Deconstructing Pompe disease by analyzing single muscle fibers: to see a world in a grain of sand. *Autophagy*. 2007;3(6):546-52.
- Roche Applied Science. 2008. *Manual del Software LightCycler 480*
- Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson (1977) DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci* 74(12): 5463-5467.
- Schultz ML, Tecedor L, Chang M, Davidson BL. Clarifying lysosomal storage diseases. *Trends Neurosci*. 2011;34(8):401-10.
- Shieh JJ, Lin CY. Frequent mutation in Chinese patients with infantile type of GSD II in Taiwan: evidence for a founder effect. *Hum Mutat*. 1998;11:306–12.

- Staretz-Chacham O, Lang TC, LaMarca ME, Krasnewich D, Sidransky E. Lysosomal storage disorders in the newborn. *Pediatrics* 2009;123(4):1191-207.
- Staretz-Chacham O., Lang T.C., LaMarca M.E., Krasnewich D., et al. Lysosomal storage disorders in the newborn, *Pediatrics*, 2009, 123: 1191-1207.
- Sugawara, K., et al. (2009). Structural modeling of mutant  $\alpha$ -glucosidases resulting in a processing/transport defect in Pompe disease. *Journal of Human Genetics*, 54, 324-330.
- Valle Esquivel Julieta. 2003. Comisión Nacional para el Desarrollo de los Pueblos Indígenas. Pueblos indígenas del México contemporáneo. Nahuas de la Huasteca. Mexico D.F. Pp 5-6.
- Van den Hout, H., Reuser, A.J., Vulto, A.G., Loonen, M.C., Cromme-Dijkhuis, A. & van der Ploeg AT.(2000). Recombinant human alpha-glucosidase from rabbit milk in Pompe patients.*Lancet*,356, 397–398.
- Van der Kraan M, Kroos MA, Joosse M, Bijvoet AG, Verbeet MP, Kleijer WJ, Reuser AJ. Deletion of exon 18 is a frequent mutation in glycogen storage disease type II. *BiochemBiophys Res Commun*. 1994;203:1535–41.
- Van der Ploeg AT, et al. Pompe's disease lysosomal storage disease 2. *Lancet*. 2008;372(9646):1342-53.
- Van Gijn & Gijssels, J.P. (2011).Pompe and his disease.*Ned Tijdschr Geneeskd*, 155, A2878.
- Vellodi A. Lysosomal storage disorders, *Br. J. Haematol.*, 2004, 128: 413-431
- Voet Donald, Voet Judit. 2006. *Bioquímica*. Tercera edición. Editorial medica panamericana. Buenos Aires Bogota. Pp. 467-469.
- Winkel LP, Hagemans ML, van Doorn PA, Loonen MC, Hop WJ, Reuser AJ, et al. The natural course of non-classic Pompe's disease; a review of 225 published cases. *J Neurol*. 2005;252(8):875-84.