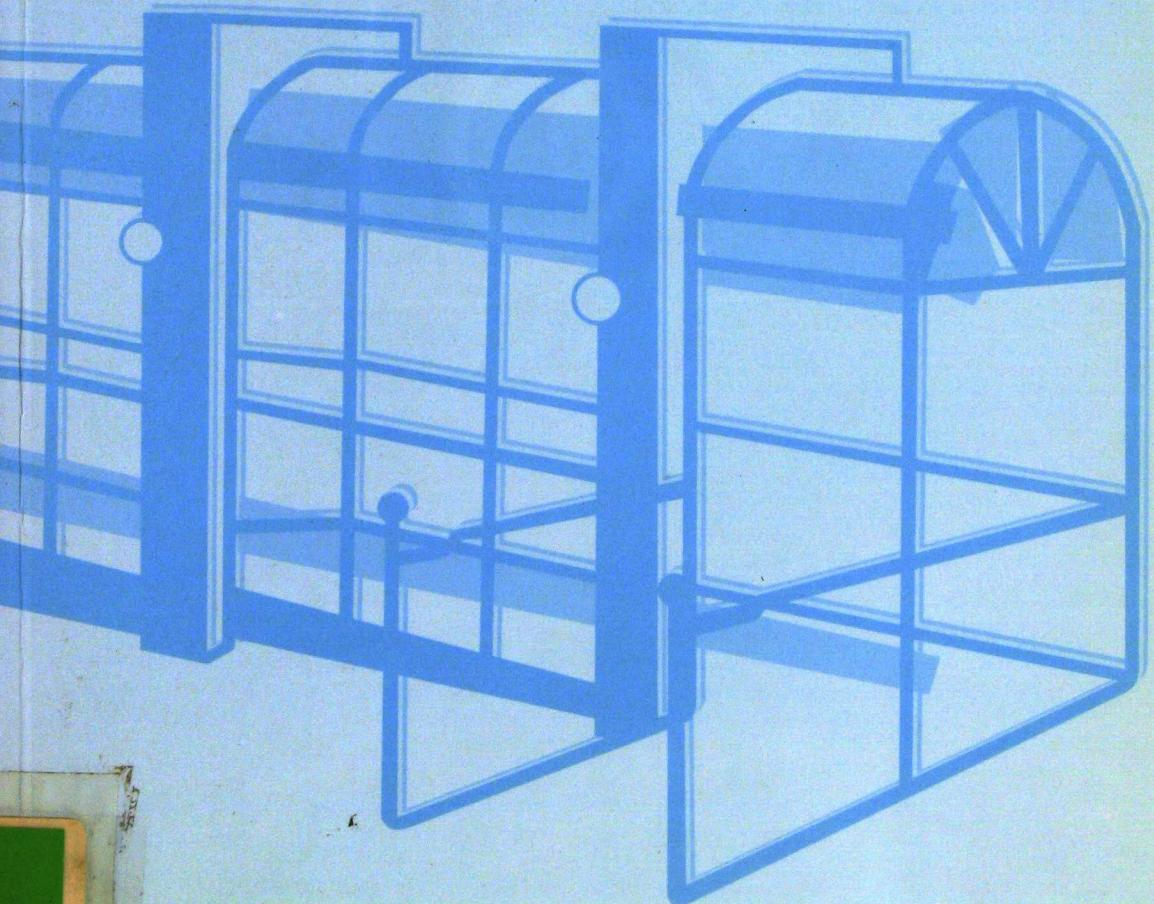


Raquel Dodelson de Kremer

**UN PROTOTIPO DE INVESTIGACION
DESTINADO A LA PREVENCIÓN DE
PATOLOGIAS GENÉTICAS NEURODEGENERATIVAS**

La Enfermedad de Sandhoff en el Valle de Traslasierra, Córdoba, Argentina



9 JUL. 1993

R. 8792

Siis

Reina Regente, 5 - Bajo
Apdo 667
20003 SAN SEBASTIAN

**UN PROTOTIPO DE INVESTIGACION DESTINADO A LA
PREVENCION DE PATOLOGIAS GENETICAS NEURODEGENERATIVAS**

**La Enfermedad de Sandhoff en el
Valle de Traslasierra
Córdoba, Argentina**

Dra. Raquel Dodelson de Kremer

Directora del Centro de Estudio de las Metabolopatías Congénitas
CEMECO
Cátedra de Pediatría y Neonatología
Facultad de Ciencias Médicas - Universidad Nacional de Córdoba
Hospital de Niños
Ministerio de Salud Provincia de Córdoba

**UN PROTOTIPO DE INVESTIGACION DESTINADO A LA PREVENCION DE
PATOLOGIAS GENETICAS NEURODEGENERATIVAS**

La Enfermedad de Sandhoff en el Valle de Traslasierra, Córdoba, Argentina

. DOCUMENTOS 36/93

. AUTORA: Raquel Dodelson de Kremer

. Memoria de la labor de investigación galardonada con el Premio "Reina Sofía" 1992, de investigación sobre prevención de las deficiencias.

. EDITA: Real Patronato de Prevención y de Atención a Personas con Minusvalía

. CUIDADO DE LA EDICION Y DISTRIBUCION: SIIS. Centro de documentación e información, concertado con el Real Patronato de Prevención y de Atención a Personas con Minusvalía. Serrano, 140. 28006 MADRID.

. IMPRIME: Artegraf. Sebastián Gómez, 5. 28026 Madrid

. Primera edición: Marzo de 1993. 1.000 ejemplares

NIPO: 380-93-003-8

Depósito legal: M. 8.945 - 1993

Dedicatoria

Este trabajo está dedicado a las decenas de mis pacientes con Enfermedad de Sandhoff que ya no existen, pero también a sus familias cuyo sufrimiento me hizo entender el sentido de mi quehacer y a mi manera, actuar.

Cuando el dolor es mirado, fija y perserverantemente mirado, tiende a ir empequeñeciéndose; el escape en cambio, siempre lo agiganta.

S U M A R I O

PRIMERA PARTE. Introducción general en el lenguaje de los defectos genéticos de las GM₂ Gangliosidosis	7
I.1. Definición de las GM ₂ Gangliosidosis. Ubicación nosológica de la Enfermedad de Sandhoff	9
I.2. Entroncamiento histórico de las dos más frecuentes GM ₂ Gangliosidosis: Enfermedad de Tay-Sachs y Enfermedad de Sandhoff	10
I.3. Gangliósidos. Estructura y función	13
I.4. Biosíntesis y transporte	16
I.5. Catabolismo de los Gangliósidos. Enzimas y activadores	18
I.6. El sistema de la β -Hexosaminidasa	22
I.7. Reacción catalítica. Especificidad de sustrato y cinética enzimática	25
I.8. Defectos moleculares en las Gangliosidosis GM ₂ . Síntesis bibliográfica	27
I.9. Mutaciones en locus de la β -subunidad de la HEX (Enfermedad de Sandhoff, Variante O)	29
SEGUNDA PARTE. La alta frecuencia del gen aberrante de la Enfermedad de Sandhoff en el Valle de Traslasierra, Córdoba, Argentina	31
II.1. Materiales y métodos	32
II.2. Resultados y discusión	32
II.2.1. El niño con Enfermedad de Sandhoff. Expresión fenotípica	32
II.2.2. Características étnicas y procedencia de las familias detectadas	41
II.2.3. Herencia	42
II.2.4. Ensayos enzimáticos	46
II.2.5. Patología. Óptica y Ultraestructural	51
Microscopía óptica (MO)	
Microscopía electrónica (ME)	

II.2.6. Análisis químico	52
II.2.7. Caracterización y análisis de los N-acetilglucosamil oligosacáridos de cadena ramificada acumulados en tejidos de la Enfermedad de Sandhoff	58
II.2.8. Diagnóstico y caracterización de la GM ₂ Gangliosidosis Tipo II (Enfermedad de Sandhoff) por análisis de los N-acetil-glucosamil oligosacáridos por cromatografía líquida de alta resolución	62
II.2.9. Estimación de la frecuencia de heterocigotos de la Enfermedad de Sandhoff en una población argentina de alto riesgo	70
. Material y métodos	
. Resultados	
. Discusión	
. Conclusiones	
. Resumen	
II.2.10. Caracterización de dos Hex B gen mutaciones en pacientes argentinos con Enfermedad de Sandhoff	80
. Resultados	
. Resumen	
II.2.11. Aplicación de las técnicas de PCR para la caracterización de las mutaciones ya identificadas de la Enfermedad de Sandhoff en la población de alto riesgo del Valle de Traslasierra de Córdoba	87
II.2.12. Caracterización de la β -Subunidad de la HEX en heterocigotos de la Enfermedad de Sandhoff	88
. Estado de avance: Resultados preliminares	
. Comentario	

TERCERA PARTE

. Resumen	103
. Referencias	105
. Agradecimientos	116
. Índice analítico	117

Primera Parte

Introducción General en el Lenguaje
de los Defectos Genéticos de las
GM₂ Gangliosidosis

I.1 Definición de las GM₂ Gangliosidosis. Ubicación Nosológica de la Enfermedad de Sandhoff.

Aplicación Clínica del Conocimiento Genético

La diferenciación de patologías fenotípicamente similares pero genéticamente heterogéneas, ha contribuido a acrecentar en forma notable el potencial profiláctico del asesoramiento genético.

La Enfermedad de Sandhoff pertenece al grupo de las GM₂ Gangliosidosis, enfermedades hereditarias caracterizadas por una acumulación del gangliósido GM₂ y algunos pocos glicolípidos relacionados. El atesoramiento es principalmente neuronal debido a un defecto en la degradación lisosomal de estos compuestos.

El catabolismo lipídico es producido por dos glicoproteínas lisosomales, Hexosaminidasa A (HEXA) y la proteína activadora del GM₂. A su vez, la HEXA está compuesta por dos distintas subunidades, α y β , codificadas en diferentes cromosomas. Hasta ahora, tres variantes enzimáticas no alélicas de GM₂ Gangliosidosis fueron identificadas (95):

1. Defecto o Deficiencia de la α -Subunidad de la HEX

(Enfermedad de Tay-Sachs o Variante B); el defecto de la α -subunidad (cromosoma 15) compromete la formación o actividad de la HEXA; en cambio la HEXB un dímero de β -subunidades, no está afectado.

2. Defecto o Deficiencia de la β -Subunidad de la HEX

(Enfermedad de Sandhoff o Variante O). El defecto o ausencia de la β -subunidad (cromosoma 5) provoca falta de actividad en las dos mayores isoenzimas, HEXA y HEXB; en este caso el atesoramiento no sólo es de glicolípidos sino también de oligosacáridos hidrosolubles derivados de glicoproteínas.

3. Deficiencia de la Proteína Activadora del Gangliósido GM₂

(Variante AB). Ambas isoenzimas HEXA y HEXB están intactas pero la ausencia de la proteína activadora (cromosoma 5) impide la degradación del gangliósido GM₂ por la HEXA.

I.2 Entroncamiento histórico de las dos más frecuentes GM₂ Gangliosidosis: Enfermedad de Tay-Sachs y Enfermedad de Sandhoff.

En 1881, el oftalmólogo británico Warren Tay (105) describió por primera vez la mancha rojo cereza en la retina de un niño de un año de edad con severo retardo físico y mental, característica que señalaba en ambos ojos, como un halo blanquecino rodeando la fovea en cuyo centro y adoptando también una forma circular, aparecía una mancha rojiza-marrón en fuerte contraste con el blanco circundante (Fig 1.1). Posteriormente, Tay reconoció otros dos niños de igual familia y un lactante de una segunda familia, todos con síntomas similares. Antes de la terminación del siglo, el neurólogo americano Bernhard Sachs (92) definió el cuadro clínico como “idiocia amaurotica familiar” ,acuñando con estos términos lo esencial del síndrome: un proceso neurodegenerativo con tres principales manifestaciones, detención y pérdida de todos los procesos mentales, progresivo debilitamiento muscular con parálisis general terminal y ceguera precoz acompañada de cambios en la mácula lútea con la invariable mancha rojo cereza seguida por atrofia óptica.

También le correspondió a Sachs la primera descripción patológica de los cambios en las neuronas y dendritas que adoptaban la forma de balón por un atesoramiento lipídico.(Fig 1.2). No hubo otros adelantos hasta que a fines de la década del '30 el bioquímico alemán Ernst Klenk (40, 41) retoma el estudio del cerebro de los pacientes con idiocia familiar y detecta un nuevo grupo de compuestos glicoesfingolipídicos ácidos (siálico), denominándolos gangliósidos. La identificación del principal compuesto atesorado en la Enfermedad de Tay-Sachs, el gangliósido GM₂ fue recién realizado por Lars Svennerholm en 1963 (101) por una simple técnica de cromatografía en capa delgada (Fig 1.3) y la elucidación de la estructura correspondió a Makita y Yamakawa (66) y Ledeen y Salsman (55) allí por los años 1963 y 1965, respectivamente. El reconocimiento del defecto básico de la Enfermedad de Tay-Sachs (deficiencia de HEXA) y prácticamente en forma concomitante el de la Enfermedad de Sandhoff (deficiencia de HEXA y HEXB), con bifurcación del tronco común de las dos entidades, se produjo con los trabajos de Okada y O'Brien (85), Sandhoff (94) y Hulterg (34) en 1969 (Fig 1.4). Una década después, Conzelmann y Sandhoff (13) descubrieron en un paciente la ausencia de un factor, la proteína activadora de la HEXA necesaria para la estimulación de el catabolismo del gangliósido GM₂ y del glicolípido GA₂. Esta forma de GM₂ Gangliosidosis, la denominaron Variante AB. (Variantes 'B', 'O' y 'AB' son denominaciones actualmente no recomendables ya que expresan la presencia y no el defecto o deficiencia de una o de las dos principales isoenzimas).

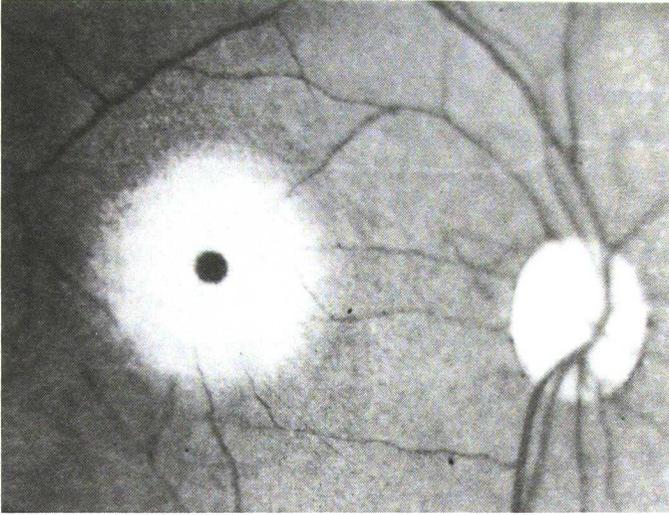


Fig. 1.1. Fotografía del fondo de ojo de un niño con Enfermedad de Sandhoff en la cual se muestra la típica mancha roja-cereza de esta entidad y de varias otras patologías de atesoramiento lipídico; descripción efectuada por Tay-Sachs por primera vez en 1881.

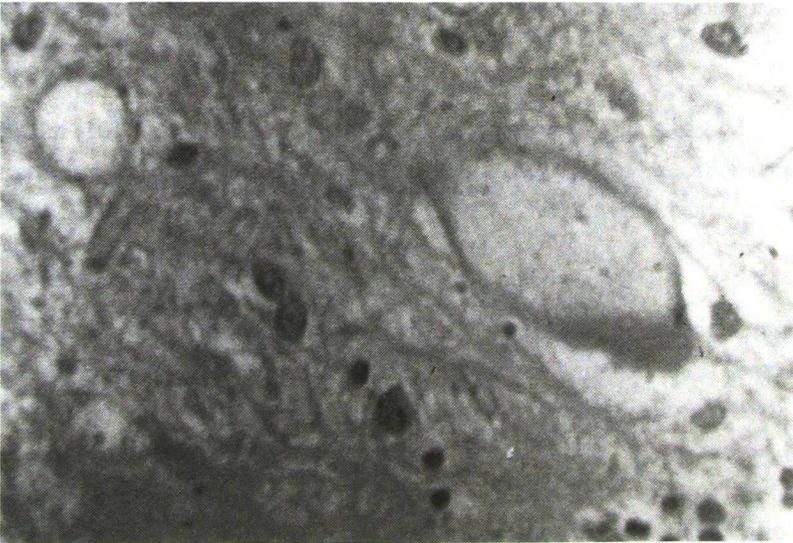


Fig. 1.2. Neurona cerebral cortical en forma de balón por el atesoramiento de material lipídico.

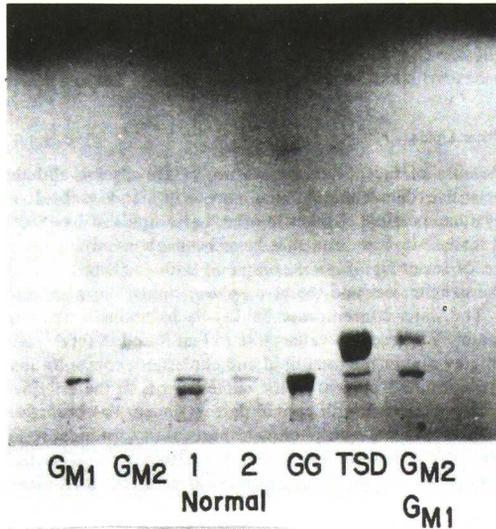


Fig 1.3. Cromatografía en capa fina de gangliósidos cerebrales. Los carriles están marcados de acuerdo a las abreviaturas siguientes: GM1, gangliósido GM1; GM2, gangliósidos; 1 y 2, fracciones de gangliósidos extraídos de cerebros normales; GG, gangliósidos procedentes del cerebro de un paciente con GM1 gangliosidosis; TSD, gangliósidos procedentes del cerebros de un paciente con GM2 gangliosidosis (Enfermedad de Tay-Sachs) Adaptado de Svennerholm.

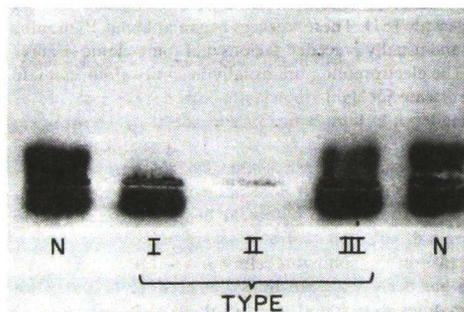


Fig 1.4. Electroforesis en gel de almidón de hexosaminidasas de hígado normal (N) y d hígado con pacientes con GM2 gangliosidosis, tipos I (Enfermedad de Tay-Sachs), II (Enfermedad de Sandhoff) y III (Enfermedad de Tay-Sachs Juvenil). Adaptación de O'kada S, O'Brien (85).

I.3 Gangliósidos. Estructura y Función

Los gangliósidos son glicoesfingolípidos conformados por dos porciones, una hidrófoba, la ceramida (N-acilesfingosina) y otra hidrofílica, la cadena oligosacárida que adiciona una o más moléculas de ácido siálico (ácido N-acetilneuramínico, ANAN o NANA). En el cerebro humano adulto, han sido identificados por lo menos 12 diferentes gangliósidos, cuatro de los cuales, según nomenclatura de Svennerholm (103), los gangliósidos GM_1 , G_{D1a} , G_{D1b} y G_{T1b} constituyen más del 90% del total (Fig 1.5). En los gangliósidos GM_2 y GM_3 , la cadena oligosacárida es incompleta, en forma de un trisacárido (gangliotriaosa) o como un disacárido (lactosa), respectivamente.

Los gangliósidos son componentes típicos de la capa externa de las membranas plasmáticas de las células animales; allí la ceramida hidrófoba está unida a la membrana y las cadenas oligosacáridas irrumpen el espacio extracelular cubriendo parcialmente la superficie celular. Junto con glicoproteínas y proteinoglicanos de membranas, los residuos de oligosacáridos constituyen el glicocálix de la superficie celular.

El mayor contenido en gangliósidos está concentrado en las membranas plasmáticas neuronales, especialmente en la región de las terminaciones nerviosas y dendritas (33, 54); por lo tanto, la masa de gangliósidos cerebrales está localizada en las neuronas, pero también en las células gliales, oligodendrocitos y astrocitos aunque con distribución de los distintos gangliósidos en 'patterns' característicos para cada tipo celular.

Svennerholm (101) introdujo una nomenclatura para los gangliósidos basada en la secuencia migratoria en cromatografía en capa delgada. En la Tabla 1.1 se correlaciona esta con la recomendada por The International Union of Pure and Applied Chemistry-International Union of Biochemistry (IUPAC - IUB). Commission on Biochemical Nomenclature (CBN).

La función de los gangliósidos en las membranas plasmáticas permanece desconocido. Sin embargo son destacables algunos aspectos que emergieron de múltiples estudios, como los sitios de fijación del Ca^{++} , parecerían actuar indirectamente en la transmisión neuronal (90); también se identificaron los gangliósidos como sitios específicos de fijación de virus y toxinas (102), en la modulación de los receptores de membrana (7, 32) y en el control del ciclo celular (107). Sobre las superficies celulares, los glicoesfingolípidos, incluyendo los gangliósidos, forman específicos 'patterns' celulares que se asumen importantes para la adhesión celular y que cambian específicamente con la diferenciación celular, morfogénesis y transformación oncogénica (31).

Tabla 1.1. Correlación de la notación para los sialoglicoesfingolípidos (gangliósidos) recomendado por la International Union of Pure and Applied Chemistry - International Union of Biochemistry (IUPAC - IUB) con la nomenclatura de Svennerholm (6)

Notación (IUPAC - IUB)	Svennerholm (1963)*
II3NeuAc-LacCer	GM3
II3(NeuAc)2-LacCer	GD3
II3NeuAc-GgOse3Cer	GM2
II3NeuAc-GgOse4Cer**	GM1
IV3NeuAc-nLcOse4Cer	GM1-GlcNAc
II3(NeuAc)2-GgOse4Cer	GD1b
IV3NeuAc, II3NeuAc-GgOse4Cer	GD1a
IV3NeuAc, II3(NeuAc)2GgOse4Cer	GT1

*G= Gangliósido. M= monosialo. D= disialo. T= trisialo. Los números arábigos indican la secuencia migratoria en cromatografía en capa fina. ** Ejemplo de descripción del GM1: II3-N-acetilneuroaminosilgangliotetrasilceramida es abreviado a II3AcNeu-GgOse4Cer para describir la estructura Gal β GalNAc β 1 4Gal (3 2NeuAc) β 1 4Glc β 1 1Cer Fuente: Watts RWE, Gibbs D (116).

Tabla 1.2. Funciones de los Glicoesfingolípidos

1. Confiere rigidez a la membrana celular por interacción del esfingol y los grupos acilos de la molécula a la Lámina externa de la bicapa lipídica.
2. Receptores y antígenos de la superficie celular.
3. Interacción y reconocimiento célula-célula Incluyendo Interacción neuroglial y reconocimiento neuromuscular.
4. Diferenciación de receptores.
5. Regulación del crecimiento celular y oncogénesis.
6. Interacción con moléculas biológicamente marcadoras o 'señales'. La extensión por la cual estas interacciones son mediadas directamente por los glicoesfingolípidos y la extensión con la que estos compuestos actúan modificando la unión a otros receptores como glicoproteínas, permanece no elucidado hasta el presente. Ledeen (23) discute la localización de los gangliósidos en las terminaciones nerviosas y de otros factores incluyendo: toxinas bacterianas, glicoproteínas hormonales, virus, Interferón, fibronectina, oploides, serotonina

Fuente: Watts R W E, Gibbs D (116) según Hakamori (31).

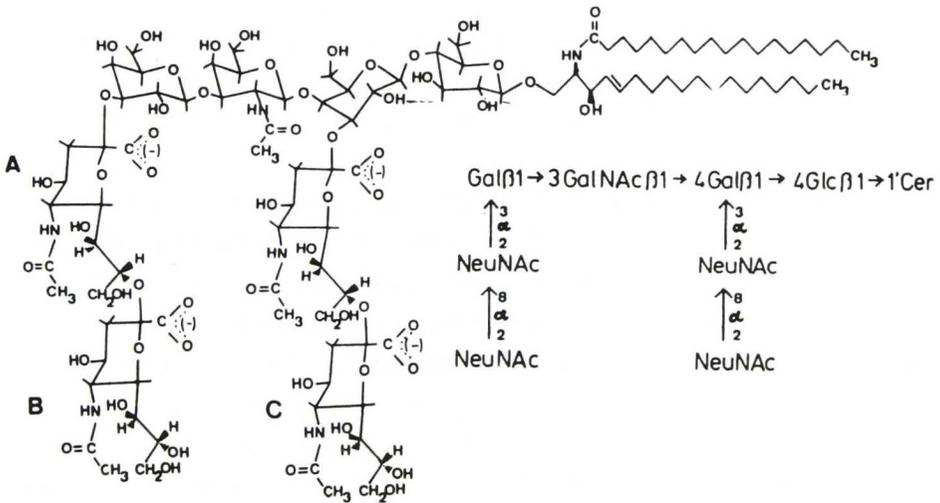


Fig. 1.5. Estructura de un gangliósido cerebral del alto peso molecular (G_{01b}). Otros gangliósidos mayores pueden derivar del a falta de uno o más residuos de ácido siálico (NeuNAc): GM_1 (-A,B,C) G_{M1} (-B,C), G_{D1b} (-C), G_{T1a} (-B), G_{T1b} (-B). (De Sandhoff K, Conzelmann E, Neufeld E F, Kaback M, Suzuki K (95)).

Un resumen de las principales funciones de los glicoesfingolípidos se encuentra en la Tabla 1.2.

Aunque las conjeturas se alinean casi sin discrepancias en que la acción funcional esencial de los glicoesfingolípidos está en la membrana plasmática, esta no representa en cambio, el sitio de biosíntesis ni tampoco el de degradación. Por lo tanto, el mantenimiento del perfil de los glicoesfingolípidos demanda un equilibrado balance entre la biosíntesis, transporte y degradación (Para una revisión ver Ref. 53).

I.4 Biosíntesis y Transporte

La biosíntesis del gangliósido comienza con la ceramida y esta lo hace por tres mecanismos:

1- Síntesis microsomal por acción catalítica de la Acil-CoA esfingosina N-acil transferasa sobre un esfingoide y un acil-CoA derivado.

2- Reacción invertida de la ceramidasa y

3- Específica reacción de la ceramida sintetasa en cerebro. (Para una revisión ver Ref. 116). Luego en forma secuencial, se van añadiendo glicosil residuos cedidos por derivados de la uridina-5'-difosfato, en tanto que los restos sialil provienen de la citidina-5'-monofosfato-ácido neuramínico.

Cada paso está catalizado por una glicosiltransferasa específica, enzimas unidas a las membranas del aparato de Golgi. De una última revisión de Schwarzmann y Sandhoff (96) sobre metabolismo e intracelular transporte de los glicoesfingolípidos proviene la Fig 1.6 que representa un esquema general de la biosíntesis de los gangliósidos y la Fig 1.7 que muestra los principales compartimientos de la célula donde tiene lugar el metabolismo de los glicoesfingolípidos. En la actualidad se estima que los gangliósidos después de su síntesis en el aparato de Golgi son transportados a la membrana plasmática por medio de vesículas (71). En las neuronas, la síntesis y el catabolismo ocurren en el soma celular pero no en los axones o terminales nerviosos. Estas últimas estructuras reciben gangliósidos por un rápido transporte axonal anterógrado y las descargan por un mecanismo axonal retrógrado. Las Refs. (51) y (52) pertenecen a investigadores de Córdoba, Argentina, cuyos trabajos sobre el tópicó aquí tratado contribuyeron marcadamente en la progresiva elucidación de los mecanismos arriba mencionados.

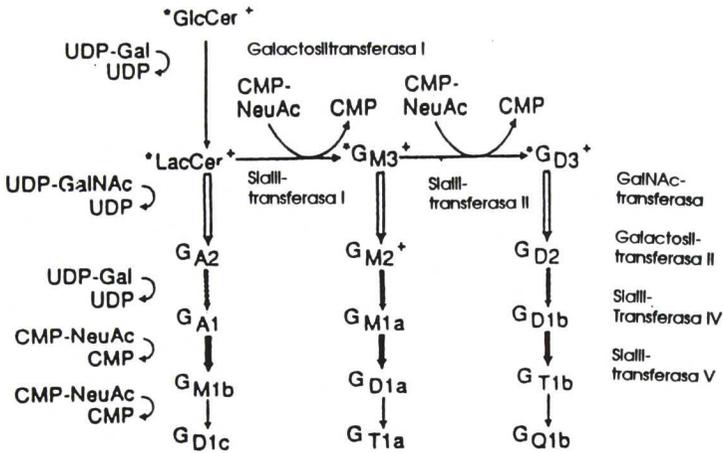


Fig. 1.6. Esquema general de la biosíntesis de gangliósidos. (Fuente: Schwarzmann G, Sandhoff K (96)).

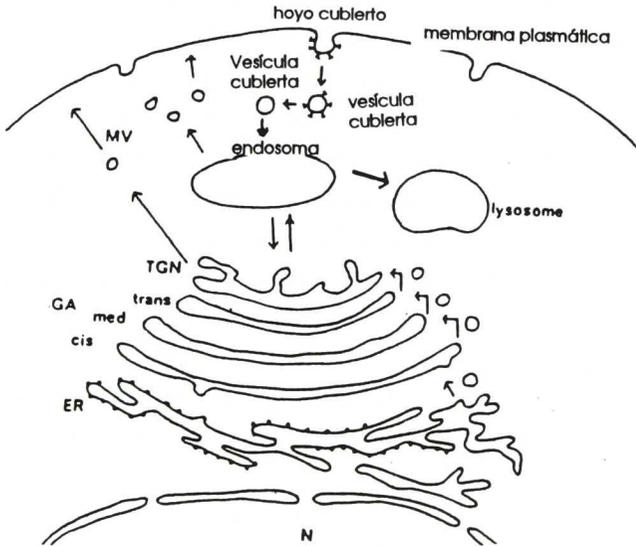


Fig. 1.7. Principales compartimentos del metabolismo glicoesfingolípido. La biosíntesis de los glicoesfingolípidos es catalizada por las transferasas unidas al retículo endoplasmático (RE), la cisterna del aparato de Golgi (AG) y la cara distal del AG o trans Golgi retículo (TGR). Los glicolípidos de la membrana plasmática puede alcanzar el lisosoma por endocitosis; su metabolismo es favorecido por exohidrolasas y proteínas activadoras de la degradación de glicolípidos en el lisosoma. VM, Vesículas membranasas; N, Núcleo. (Fuente: Schwarzmann G, Sandhoff K (96)).

I.5 Catabolismo de los Gangliósidos. Enzimas y Activadores

El catabolismo de los gangliósidos y otros esfingolípidos ha sido estudiado intensamente en numerosos laboratorios durante los últimos 20 años. El interés relevante ha derivado de que todas las enfermedades por atesoramiento de gangliosidos reconocidas hasta ahora, derivan de defectos en su degradación. Aunque la deficiencia hereditaria de una reacción catalítica causa acumulación lisosomal de sus respectivos sustratos, estos defectos son por lo general de gran heterogeneidad, tanto bioquímicamente como clínicamente. Por otro lado, las deficiencias genéticas de las hidrolasas lisosomales se pueden encontrar en todos los órganos, fluidos y células (excepto en los eritrocitos) pero el acúmulo del lípido, gangliósido u otro esfingolípido, se realiza predominantemente en el órgano en el cual se sintetiza; así defectos en el catabolismo de los gangliósidos el acúmulo es sobre todo neuronal (78).

Las cadenas de carbohidratos de los gangliósidos son degradados secuencialmente en sus extremos no reductores por una serie de exoglicosidasas. Excepto para la sialidasa o neurominidasa (EC 3.2.1.18), enzima de la membrana plasmática que cataliza la desialización de los oligosialilgangliósidos a monosialogangliósidos en la misma membrana plasmática, todas las enzimas son intralisosomales con un máximo de actividad en un rango de pH ácido. Como fenómeno importante y general, la especificidad de cada una de ellas está dirigida más hacia el tipo de unión que al sustrato individual; de tal manera que una misma enzima cataliza uniones similares en glicoesfingolípidos, glicoproteínas y oligosacáridos. Estas consideraciones se aplican tanto para glicoconjugados de muy alto peso molecular como otros compuestos de bajo peso molecular. Para el caso de las glicoproteínas, el clivaje de la cadena oligosacárida de la cadena peptídica se produce por una endoglicosidasa (β -endo-4-acetil-glucosaminidasa). Esta enzima separa la cadena oligosacárida en el amino ácido asparagina y el punto de residuo de la ramificación de la manosa. Un esquema parcial de la degradación de una glicoproteína es mostrado en la Fig. 1.8 perteneciente a P. Durand y G. O'Brien (23); allí también se señalan los bloqueos enzimáticos de algunos errores congénitos.

A título de información general (114), la degradación lisosomal de los gangliósidos cerebrales y los bloqueos metabólicos involucrados en la GM₁ y GM₂ Gangliosidosis se muestran en la Fig. 1.9.

En breve, uno de los mayores gangliósidos, el trisialogangliósido GT₁, pasa en mayor proporción al GD_{1b} (disialogangliósido) y al GD_{1a} en menor cuantía, por acción de las sialidasas. Al llegar al gangliósido monosialico GM₁, actúa una β -galactosidasa que da origen al otro gangliósido monosialico el GM₂, que continúa degradándose a GM₃ por la acción de la 3-N-acetilgluco o galactosaminidasa.

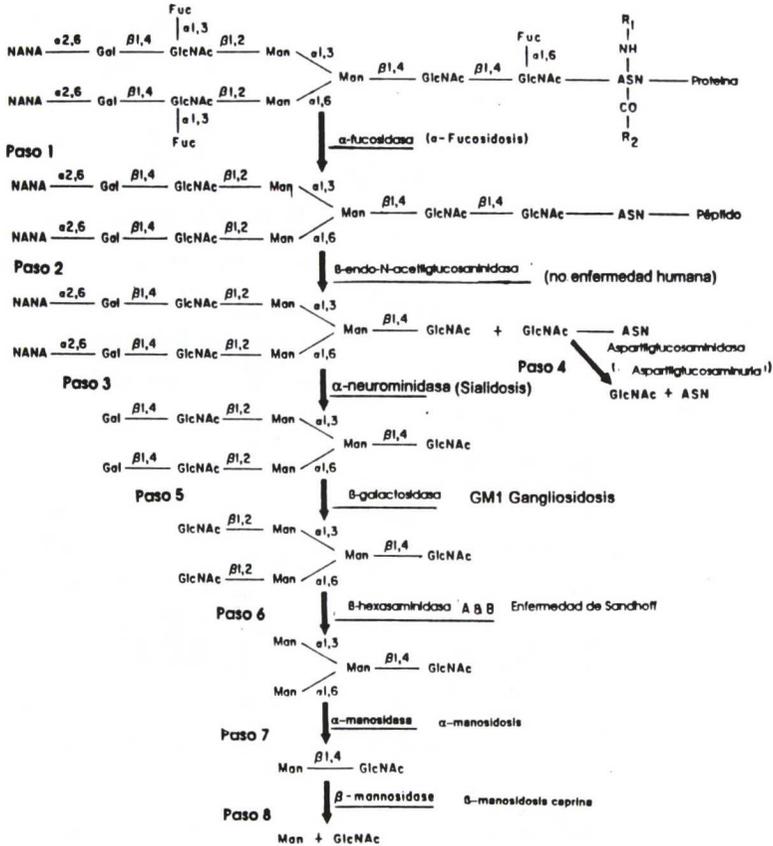


Fig. 1.8. Un esquema hipotético del catabolismo lisosomal de la cadena lateral oligosacárido-asparagina de una típica glicoproteína. También se muestran algunos específicos defectos enzimáticos y las respectivas patologías que provocan (De Warner T G, O'Brien J S(114)).

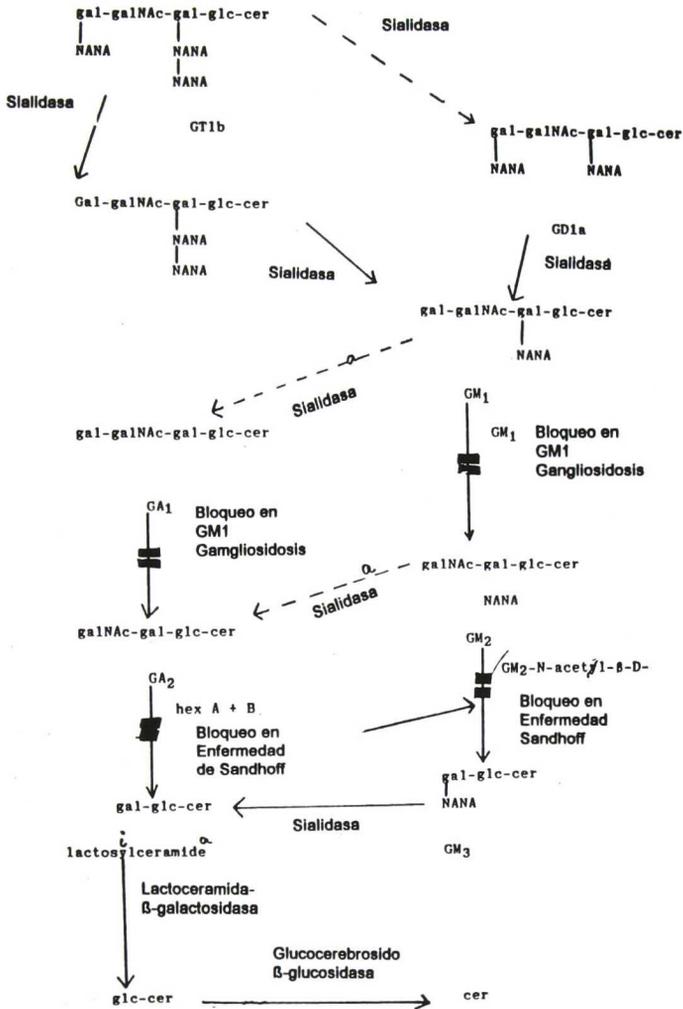


Fig. 1.9. Catabolismo lisosomal de los gangliósidos cerebrales y señalamiento de los bloqueos metabólicos involucrados en las GM₁ y GM₂ gangliosidosis. (De Warner T G, O'Brien JS (114))
ANAN o NANA: Acido N-acetilneuramínico o Acido Siálico.

El GM_3 , por acción de otra sialidasa es transformado en lactosilceramida que da origen al glucocerebrósido; una β -glucosidasa produce el desdoblamiento del glucocerebrósido en glucosa y ceramida continuando la degradación de esta última por la ceraminidasa en sus dos productos terminales, el esfingol y el ácido graso correspondiente.

Varias proteínas (no-enzimáticas) que estimulan la degradación enzimática de los glicoesfingolípidos han sido aislados de los lisosomas. Existe considerable evidencia que tienen una función in vivo similar a lo que tienen los detergentes en las condiciones de sistemas de ensayos in vitro; en estos casos, cuando los detergentes se añaden en concentraciones adecuadas, se unen a los glicolípidos formando pequeñas micelas de donde protruyen bien separadas las cadenas oligosacáridas tornándose accesibles a la acción de las hidrolasas. En la Tabla 1.3 se muestran las proteínas activadoras requeridas por la arilsulfatasa A, β -galactosidasa, β -hexosaminidasa A, α -galactosidasa A, y β -glucocerebrosidasa. Una revisión de sus aspectos bioquímicos fue realizado por Li y Li (58) y Sandhoff (93). Un modelo general del modo de acción de una proteína activadora ha sido propuesto y el cual es mostrado en el diagrama de la Fig. 1.10.

En el caso de la HEXA, el modelo de Sandhoff (93) es ampliamente reconocido e ilustra en forma muy clara el posible mecanismo de acción del GM_2 -activador como factor estimulador para la degradación del gangliósido GM_2 y también la capacidad de una proteína para transferir glicoesfingolípidos. (Fig 1.11) Este activador se une ya sea a los sustratos naturales, gangliósidos GM_2 y GA_2 , o bien al sustrato sintético p-nitrofenil-N-acetil- β -D-glucosamida-6-sulfato (PG6S) y por otra parte al sitio activo de la α -subunidad de la HEX.

Los sustratos sintéticos, p-nitrofenil (PNF) y 4-metilumbelliferil (MU) β -N-acetilglucosaminósidos y PNF y MU- β -N-acetilgalactosamidósidos, se unen al sitio activo de la β -subunidad, donde son más rápidamente desdoblados que a nivel de la α -subunidad. Estos datos provienen de hallazgos experimentales de Kytzia y col. (47) y de Sandhoff (93) y brindaron las bases de la especificidad de sustratos y estructura de las subunidades de la HEXA y HEXB. En forma resumida, la HEXA contiene ambas subunidades, α y β , y cataliza la hidrólisis del complejo gangliósido GM_2 -proteína activadora y a todos sustratos sintéticos. La HEXB, homopolímero de β subunidades, cataliza la hidrólisis del PNF y MU- β -N-acetilglucosaminósidos y β -N-acetilgalactosaminósidos pero no actúa sobre el complejo gangliósido GM_2 -proteína activadora ni sobre el PG6S. Sin embargo, la β -subunidad debe actuar de alguna manera sobre el complejo ya que la HEXS, homopolímero de α -subunidades presente en los pacientes con Enfermedad de Sandhoff, es un catalizador ineficiente para la hidrólisis del gangliósido GM_2 .

I.6 El Sistema de la β -Hexosaminidasa

La existencia de una N-acetil- β -D-glucosaminidasa en tejidos de mamíferos fue ya reconocida en 1936 (115). Posteriormente se encontró que los β -glicósidos de los dos aminoazúcares, N-acetil-D-glucosamina y N-acetil-D-galactosamina, eran hidrolizados por la misma enzima denominada β -hexosaminidasa (HEX, EC 3.2.1.52) Su ubicación lisosomal fue demostrada por fraccionamiento subcelular (97, 11).

En 1968, Robinson y Stirling separaron la HEX en dos isoenzimas, una forma ácida A y una forma básica B (91). La relación entre ambas isoenzimas fue clarificada por análisis inmunológicos y bioquímicos. Ambas isoenzimas resultaron oligómeros con una β -subunidad en común para la HEXA y HEXB y una α -subunidad única para la HEXA (99). Subsecuentemente, una tercera isoenzima fue descubierta en pacientes con Enfermedad de Sandhoff, la isoenzima S, compuesta solamente por a subunidades (36, 3, 27).

La teoría de las dos-subunidades fue confirmada por el uso de la genética de células somáticas. Las dos cadenas polipeptídicas requieren dos loci genéticos, uno de los cuales, la subunidad β , requiere la expresión del gen en el cromosoma 5, mientras que para la HEXA se requiere la expresión tanto en el cromosoma 5 como en el 15 (50, 5, 9, 10). El clonado y secuenciamiento de los cADN ha demostrado de las dos subunidades, α y β , tienen largos trechos de idénticas secuencias, particularmente en sus porciones centrales (73, 43). La homología global de los aminoácidos es de un 57 por ciento.

También se comprobó una considerable similitud en la organización de los respectivos ADN genómicos (88, 89). Se especula que los genes que codifican las cadenas α y β provendrían de un gene ancestral común.

A semejanza de otras hidrolasas ácidas, las HEX(s) son glicoproteínas que sufren un proceso de modificaciones post traslacionales hasta alcanzar los lisosomas (44, 109). La secuencia de aminoácidos deducidos del cADN mostró que tanto las cadenas α como las β tienen características señales-secuencias hidrófobas en el NH_2 terminal que facilitan la entrada en el lumen del retículo endoplasmático. Las señales son separadas y las dos cadenas comienzan la glicosilación de los residuos de asparagina. Las porciones oligosacáridas son entonces modificadas para cargarse con los grupos manosa-6-fosfato, señales necesarias para el reconocimiento por los específicos receptores de la membrana lisosomal. No es conocido cuales son las estructuras que adoptan las cadenas polipeptídicas

Tabla 1.3. Proteínas activadoras para la degradación esfingolipídica lisosomal

Sustrato	Enzima	Activador aislado de	Peso Molecular	Punto Isoeléctrico	Referencias
Sulfatos	Arisulfatasa A	Hígado	21.500 Gf	43	Fischer y Jatzkewitz, 1975 (24)
Gangliósido GM1 y Glicolípido GA2	β -Galactosidasa	Hígado	22.000 GF	41	Li y Li, 1976 (57)
		Hígado de un paciente GM1 gangliosidosis	27.000 Gf	4.1 y 4.6	Inui y Wenger, 1982 (37)
Gangliósido GM2 y Glicolípido GA2	β -Hexosaminidasa A	Riñón	22.000 Gf	48	Conzelmann y Sandhoff, 1979 (14) Conzelmann et al, 1982 (12). Li et al., 1981 (56)
		Hígado	23.500 Gf		
Globotriaosceramida	-Galactosidasa A	Hígado	20.500 Gf	4.7 y 4.8	Gärtner et al., 1983 (26)
Glucosceramida	Glucosceramida β -glucosidasa	Bazo bovino	20.400 Gf 4.900 Gf	4.3-4.4	Berent y Radin, 1981 (2)

Fuente: Watts RWE, Gibbs D (116) según Sandhoff (93).

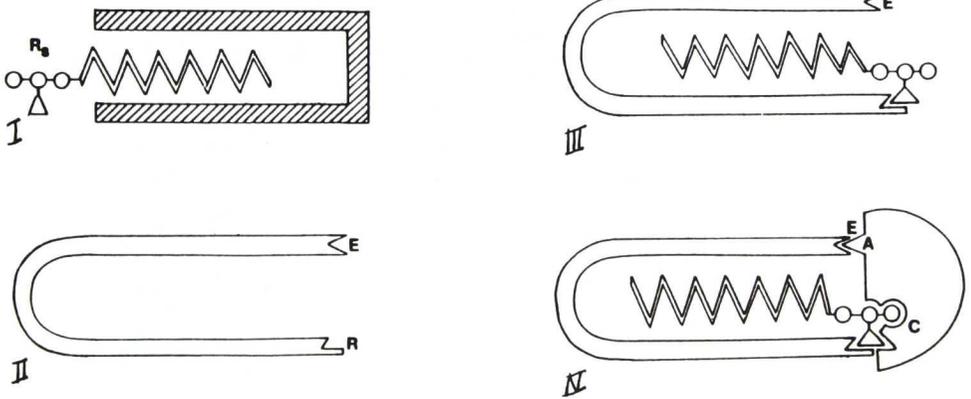


Fig. 1.10. Un modelo general de acción de los activadores-proteínas de los glicosfingolípidos. El activador II se une por su sitio de reconocimiento 'R' a la fracción oligosacárido "Rs" del sustrato, fuera de la membrana a la cual está unido este último en su porción hidrófoba. El sustrato se acomoda en un repliegue hidrófobo en el activador III. La enzima tiene un sitio de reconocimiento 'E' y que ubica el sustrato sobre el sitio activo 'C' de la enzima, configurando un complejo ternario IV, sustrato-proteína activadora-enzima. (Fuente: Watts R W E, Gibbs D (116)). Según Conzelmann E, Sandhoff K (14) y Sandhoff K (93).

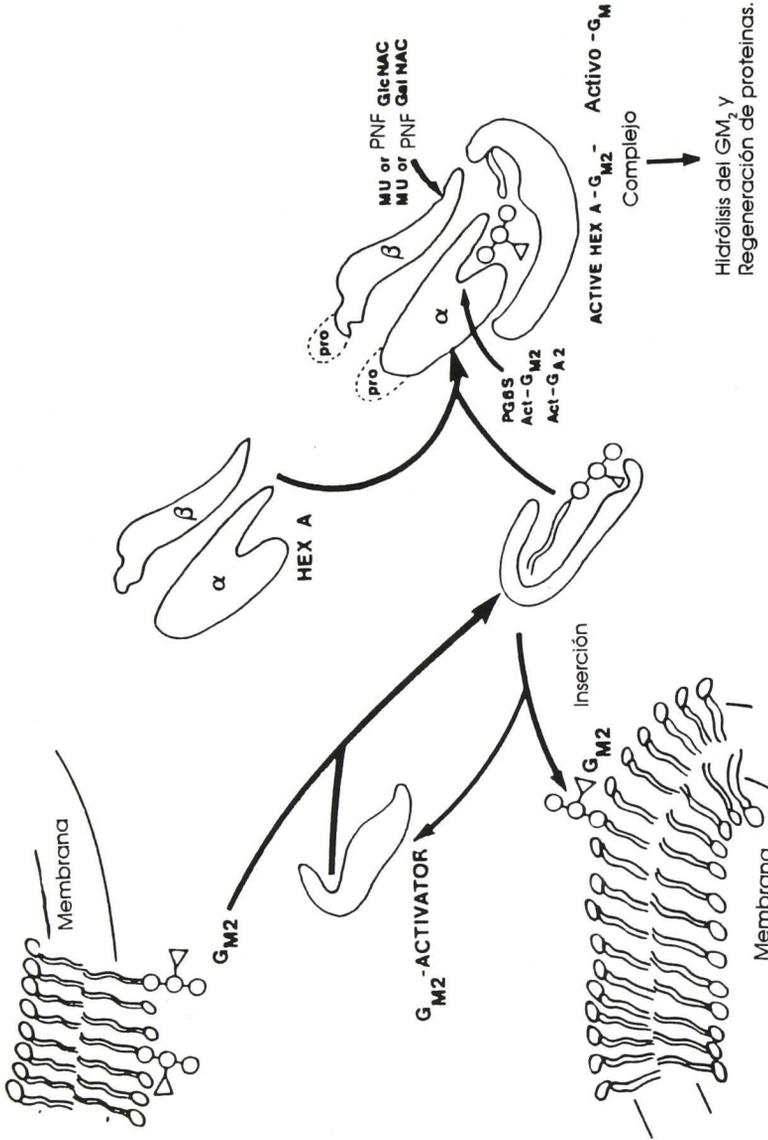


Fig. 1.11. Modelo de la acción de la GM₂-activador como factor estimulador del catabolismo del gangliósido GM₂ y como una proteína transferible de glicolípido. Se propone que la HEX A tiene diferentes sitios catalíticos en las α y β subunidades. Los sustratos fisiológicos, activador-gangliósido GM₂ y GA₂ complejos (Act-GM₂ y Act-GA₂) y el sustrato p-nitrofenil-N-acetil-β-D- glucoaminide-6-sulfato (PG6S) se unen solamente al sitio catalítico de la α-subunidad; los sustratos sintéticos p-nitrofenil (PNF) y 4-metilumbelliferil derivados (MU) del β-N-acetilglucosaminidósido y el β-N-acetilgalactosaminidósido (PNFGLcNac, PNFGalNac, MUGLuNac, MUGalNac) son claramente hidrolizados más rápidamente a nivel del sitio activo de la β-subunidad. Las áreas de las dos subunidades marcadas como 'pro' indican las regiones removidas durante el proceso proteolítico post-translacional de la enzima. (Fuente: Watts R W E, Gibbs D (116) según Conzelmann E, Sandhoff K (36), Sandhoff (93) y Sandhoff K y col (95)).

para prevenir su asociación precoz ni tampoco donde se asocian las cadenas polipeptídicas para prevenir su asociación precoz ni tampoco donde se asocian las cadenas β para formar la HEXB. Aunque hay acuerdo general que la HEXA y HEXB tienen una masa molecular de cerca 120.000 (+/- 20.000) Da, el número de subunidades ha sido motivo de discusiones. Actualmente está claro que la HEXA madura tiene una sola cadena α , de aproximadamente 50.000 Da. Para el caso de las cadenas β , la situación es más complicada; Mahuran y col. (65, 64) describieron dos fragmentos en la β madura, $\beta\alpha$ y $\beta\beta$ y denominaron a la HEXA y HEXB con $\alpha(\beta\alpha\beta)$ y $(\beta\alpha\beta)_2$, respectivamente. (Fig. 1.12)

Existen otras isoenzimas con pI intermedios en la migración electroforética, designadas I o P, esta última elevada en el suero de la embarazada. Las formas I y P del suero parecen ser distintas formas de glicosilación de la HEXB, mientras que la forma I aislada de hígado y placenta se relacionaría con la HEX A (64, 62, 19). Una isoenzima conocida como HEXC, no lisosomal sino de localización citosólica, es una específica β -N-acetilglucosaminidasa con actividad óptima a pH neutro. Su función biológica permanece desconocida. (25, 6, 86).

I.7 Reacción Catalítica. Especificidad de sustrato y cinética enzimática

Las HEX(s) son específicas para ciertos residuos de azúcares, (N-acetilglucosamina y N-acetilgalactosamina) en uniones β -anoméricas. In vivo, estas enzimas son activadas por una variedad de glicoconjugados, incluyendo el gangliósido GM₂, el gangliósido GA₂ (asiático), el globósido (ceramida tetrahexosa), los glicosaminoglicanos y los oligosacáridos derivados de glicoproteínas. In vitro, son usualmente determinadas mediante el empleo de sustratos artificiales como el cromogénico, p-nitrofenil o el fluorogénico, 4-metil-umbelliferil, glicósidos.

Kresse y col. y Ludolph y col. (46, 63) demostraron una reacción muy inusual provocada por la HEXA: ella libera intacto a la N-acetilglucosamina-6-sulfato del extremo reductor del keratan-sulfato con los sustratos artificiales p-nitrofenil o 4-metilumbelliferil-6-sulfo-N-acetilglucosaminidósidos.

Evidencias recientes sugieren que ambas subunidades, α y β , tienen un sitio activo pero con diferente especificidad de sustrato (48). Con los sustratos neutros solubles en agua, generalmente los más usados, las constantes cinéticas de la HEXA y HEXB son muy similares. Igualmente el pH óptimo de ambas, es prácticamente igual, de 4.4. En cambio la HEXS, compuesta solo por α - subunidades, hidroliza el 4-metilumbelliferil- β -D-N-acetilglucosaminidósido a un pH óptimo de 4.8 a 5 (27, 87). Los

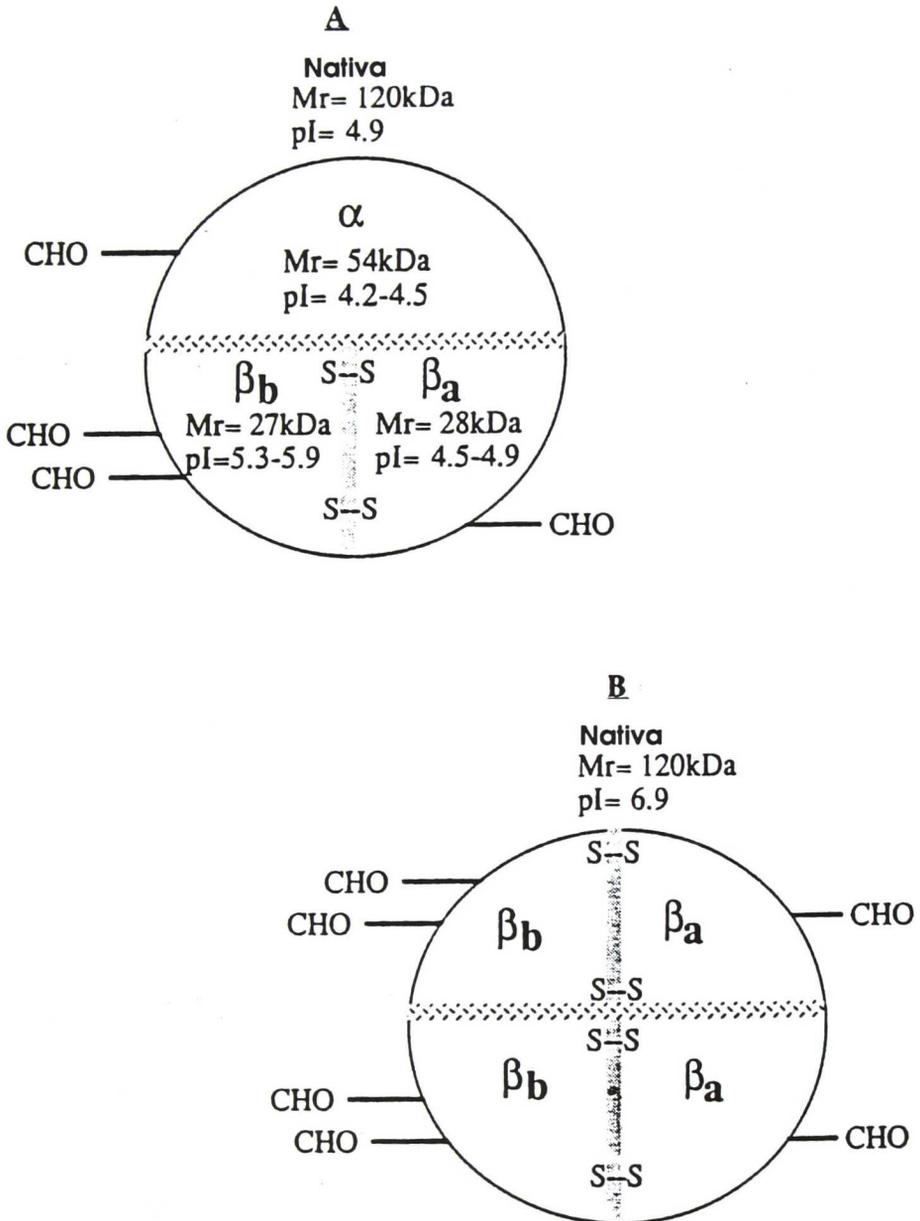


Fig. 1.12. Esquema de la estructura HEXA y B mostrando que la HEXA es un heteropolímero compuesto por α y β subunidades, en cambio la HEXB es un homopolímero compuesto por dos β -subunidades. La β -subunidad esta constituida por dos polipéptidos, unidos por puentes disulfuro que derivan de un clivaje proteolítico de un único pro- β polypeptide en el lisosoma. (De Gravel R, Mahuran D J (61)).

sustratos artificiales 6-sulfo-N-acetilglucosaminodósidos (PNP y MU) son para los ensayos o de las HEXA o de la HEXS, no para la HEXB y actúan a un pH óptimo de 3.8.

Las constantes de Michaelis para el PNF y el MU- β -D-N-acetilglucosaminidósidos están usualmente entre 0.3 a 1 mM. para las tres isoenzimas, A, B y S, dependiendo de las condiciones del ensayo (87). Los 6-sulfo-N-glucosaminidósidos son hidrolizados por la HEXA con valores menores de Km (1,25 y 0,31 mM) y mucho más altas las velocidades máximas (2,24 y 25 $\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mg})$) para el p-nitrofenil y 4-metilumbelliferil sulfatados glucósidos respectivamente, que para aquellos encontrados para la HEXB (Km 3,4 mM, Vmáx 1.2 $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$) con el 4-MU sustrato (48). (Para una detallada revisión de este aspecto, ver Ref. 95).

I.8 Defectos Moleculares en las Gangliosidosis GM₂: Síntesis Bibliográfica

Los tres-loci que dan origen a los tres-polipéptidos del sistema de la HEX necesarios para la degradación del gangliósido GM₂, son los que dan origen a las tres mayores deficiencias genéticas (Fig 1. 13). La mutación puede ocurrir en el locus de la α -subunidad provocando una deficiencia de la HEXA, en el locus de la β -subunidad produciendo una deficiencia de la HEXA y HEXB, y a nivel del locus del activador del GM₂, resultando en la deficiencia de la proteína activadora. Dentro de este grupo mayor, existen numerosas mutaciones que pueden provocar una total incapacidad de hidrólisis del gangliósido GM₂ con las muy graves manifestaciones clínicas de otras formas infantiles o bien otras mutaciones que permiten una cierta actividad enzimática parcial que resulta en enfermedades de expresión más tardía o de evolución menos severa.

Las mutaciones también pueden subdividirse en aquellas donde no es posible reconocer inmunológicamente la proteína-enzima (cross-reactive-material-negative, CRM -) y aquellas en las cuales la proteína es reconocible (CRM +) aunque puede ser defectuosa en el procesamiento postranslacional, transporte, estabilidad o actividad catalítica.

Para una completa revisión de las mutaciones en el locus de la α -subunidad y en el locus del GM₂ activador, ver Ref. 95, 77.

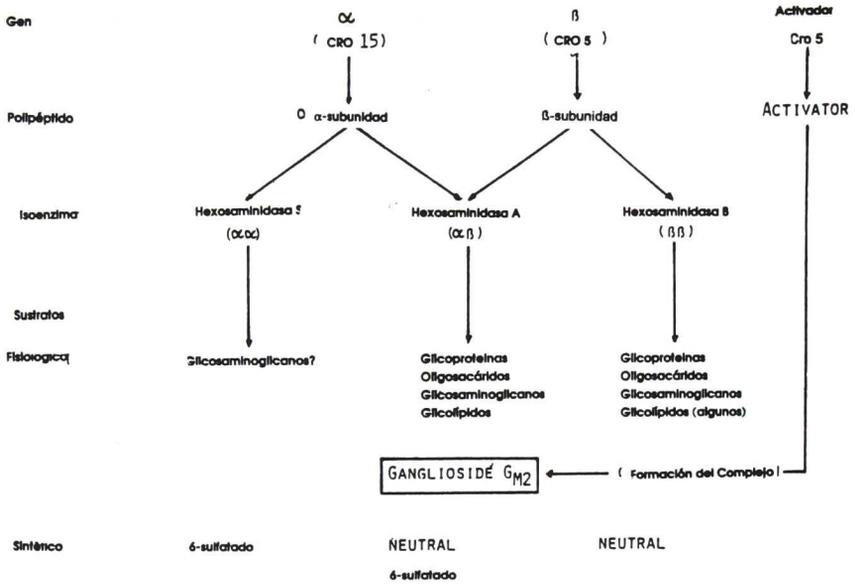


Fig. 1.13. Sistema de la β -hexosaminidasa. Tres polipéptidos, codificados en genes diferentes, son necesarios para la degradación del GM₂; las subunidades α y β de la HEXA y la proteína-activadora ligadas al gangliósido constituyendo el complejo terciario. (De Sandhoff K, Conzelmann E, Neufeld E F, Kaback M, Suzuki K (95)).

I.9 Mutaciones en locus de la β -subunidad de la HEX (Enfermedad de Sandhoff, Variante O)

A semejanza de las mutaciones de la α -subunidad, las de la β -subunidad constituyen un grupo heterogéneo. Tanto mutaciones con CRM(+) como CRM(-) fueron detectadas, con una expresividad clínica correlacionada a la actividad residual de la HEX. O'Dowd y col. (82) estudiaron 16 líneas celulares de pacientes con Enfermedad de Sandhoff. Ellos analizaron el gen de la β -subunidad, las cadenas pre β -polipeptídicas del ARNm y la actividad residual de la HEX; todas las líneas juveniles tuvieron normal o reducido niveles de las cadenas pre β -polipeptídicas del ARNm y no se encontraron groseras alteraciones en el gen de la HEXB. De las 11 líneas de las formas infantiles, en cuatro de ellas no fueron detectadas las pre- β -cadenas del ARNm. En este grupo, dos líneas celulares presentaron deleciones parciales localizadas en la terminación 5' del gen de la HEXB.

Un adulto normal y su hija, ambos con prácticamente total deficiencia de HEXB pero con significativa actividad residual de la HEXA fueron descriptos por Dreyfus y col. (21, 22).

Esta mutación, denominada "HEX Paris", fue también reconocida por su fenotipo bioquímico en otro adulto asintomático y en dos pacientes, uno de los cuales fue previamente descripto como Enfermedad de Sandhoff Juvenil (De ref. 1 el N°252a).

El polipéptido de la cadena β fue siempre hallado de ser más grande que el normal, debido a la falta de procesamiento postranslacional. Una pequeña parte de la cadena se procesaba normalmente y era la que se incorporaba a la HEXA. La HEX Paris ha provisto cierta claridad sobre la función de la HEXB. Esta isoenzima no tendría como exclusividad la función catalítica ya que su ausencia no traería efectos adversos siempre que la actividad para la HEXA. De allí que Sandhoff y col. (95) sugirieron que la función de la HEX B sería principalmente de hidrolizar algunas partes de sustratos hidro-solubles; en cambio la HEX A tendría la exclusiva función de degradar al gangliósido GM₂ y otros glicolípidos.

Segunda Parte

La Alta Frecuencia del gen aberrante de la Enfermedad de Sandhoff en el Valle de Traslasierra, Córdoba, Argentina.

En esta presentación, la estructura del texto ha sido elaborada a partir del jalonamiento de las etapas que se fueron desarrollando a lo largo de toda la investigación sobre el tema. La recopilación abarca partes de publicaciones, comunicaciones a congresos, aspectos inéditos y datos del estado de avance de la labor actual.

II.1 Materiales y Métodos

Para una detallada descripción de este apartado, se encontrará indicado a título de encabezamiento de las diferentes secciones de la exposición, la o las correspondientes referencias índices de nuestra autoría o coautoría.

II.2 Resultados y Discusión

1980 De Kremer R., De Levstein. *Medicina* (Buenos Aires) 40 : 55 (17)

1985 De Kremer R., Boldini C.D., Capra A.P., Levstein I.M., Bainttein N., Hidalgo P.K., Hliba E.J. *Inher. Metab. Dis.* 8 : 46 (16).

II.2.1 El niño con Enfermedad de Sandhoff. Expresión Fenotípica

El típico curso evolutivo de los pacientes con esta enfermedad está ilustrado a través de las fotografías de las Figs. 2.1 ~ 2.4. Los niños son aparentemente sanos en el nacimiento y desarrollan normal hasta los tres a seis meses de edad. Sin embargo, gradualmente el sistema nervioso central va degenerando debido a la acumulación del esfingolípido gangliósido GM₂. Algunos de los primeros signos de deterioro que notan los padres, son una moderada debilidad motora y una respuesta incrementada a los ruidos súbitos. Lentamente las adquisiciones previas, sostén de la cabeza, sentarse e incluso gatear, se van perdiendo; el niño deja de sonreír y no fija la mirada; comienza la paulatina desconexión con el ambiente que lo circunda; la ceguera progresa y no hay respuesta a ningún estímulo social. Sin excepción, entre los 8 a 12 meses de edad, el deterioro físico y mental es obviamente severo. El examen neurológico demuestra una hipotonía axial extrema con nuca colgante, hipertonía de los miembros inferiores en extensión con equinismo irreductible de los pies; hiperreflexia osteotendinosa generalizada con difusión de la respuesta refleja, policinetismo, extensión de zonas reflexógenas, trepidación epileptoide de los pies; signo de Babinski bilateral; hiperacusia (los ruidos desencadenan sobresaltos musculares generalizados con hiperextensión y pronación de los miembros superiores y triple retracción de los miembros inferiores). La mancha rojo cereza en la retina está presente en el 100% de los casos.

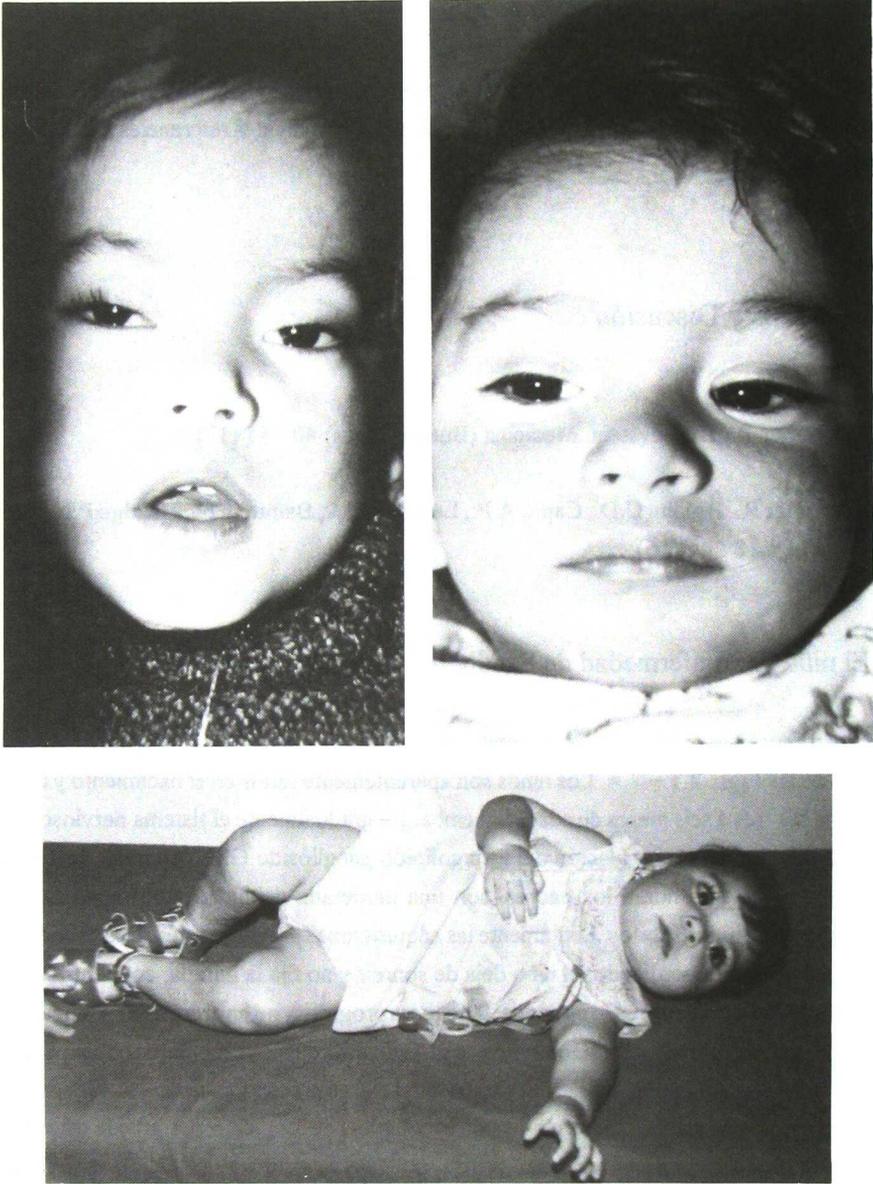
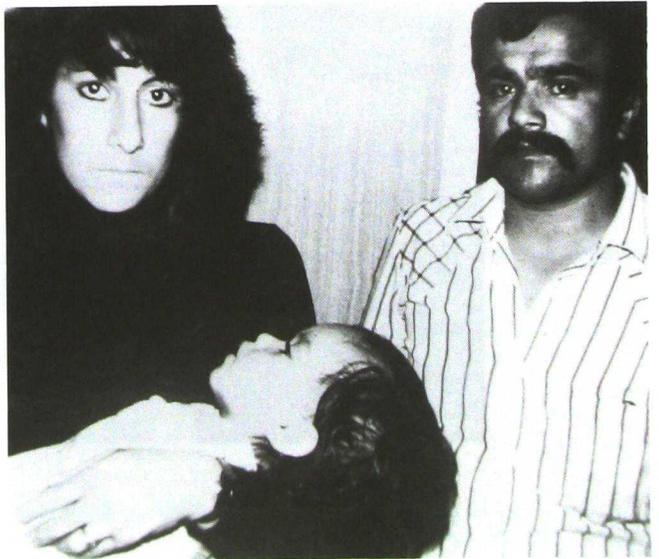
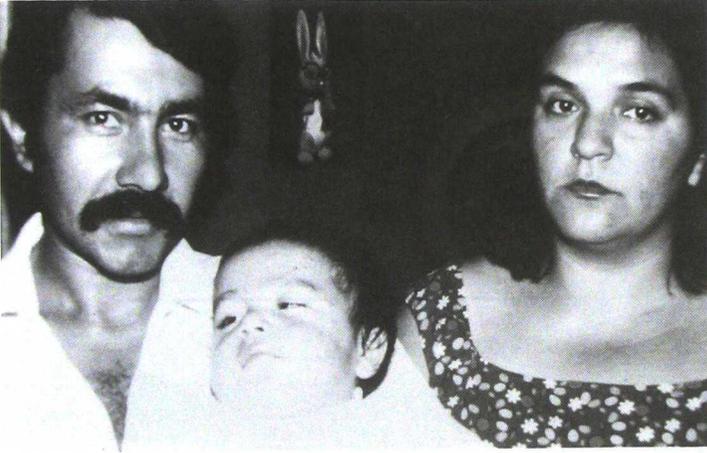


Fig 2.1. Manifestaciones clínicas iniciales en la Enfermedad de Sandhoff. Cada fotografía corresponde a un paciente diferente.

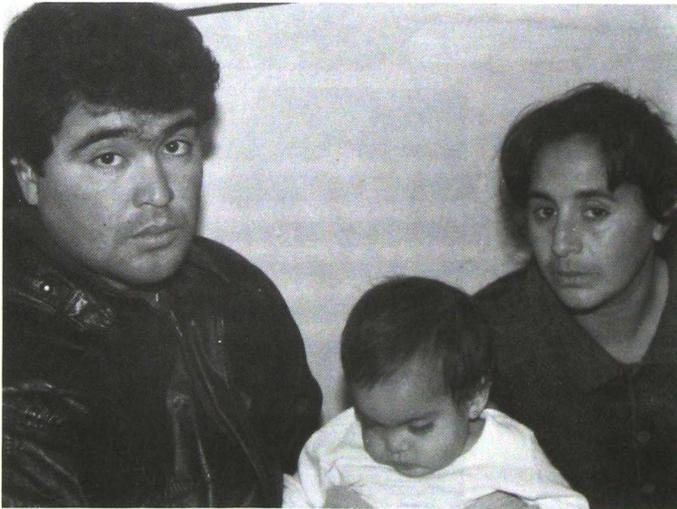
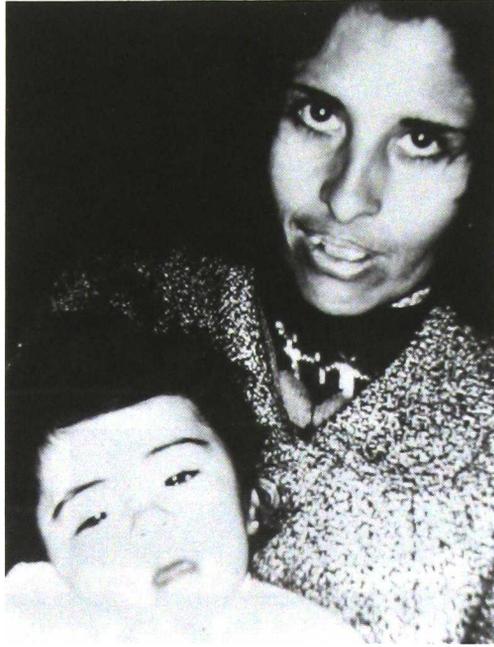
Niños sin dismorfias, buen estado general, progresivo compromiso del sensorio, ausencia de la sonrisa social, detención y pérdida de las adquisiciones de maduración neurológica correspondientes a la edad (5 - 10 meses).

Nótese el extraordinario parecido de los padres, con típicos rasgos criollos.

Continuación figura 2.1.



Continuación figura 2.1.



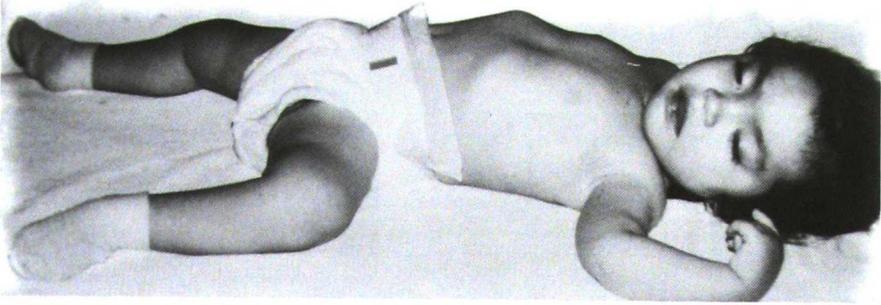
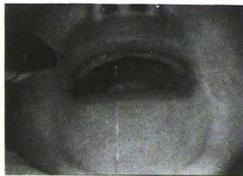
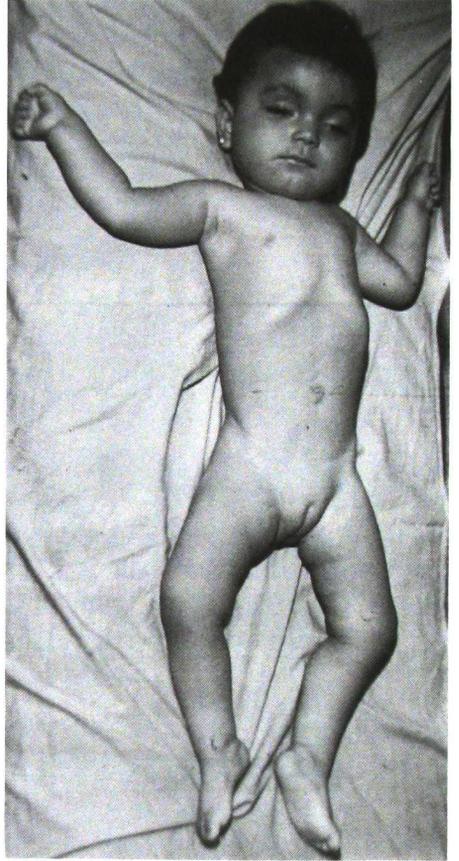
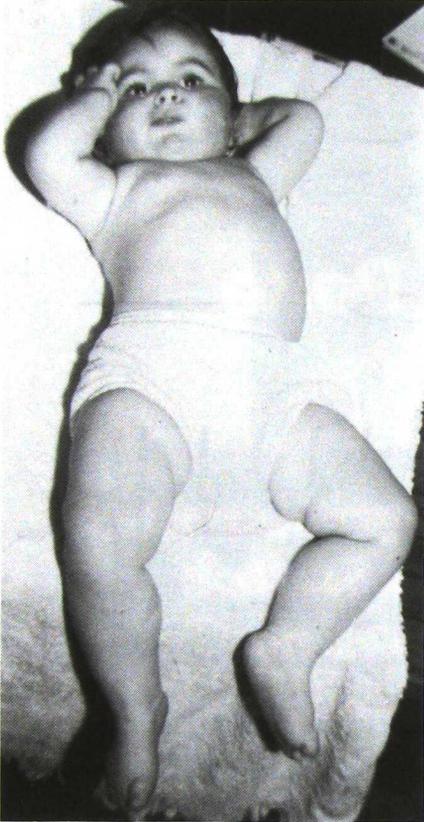


Fig. 2.2. Período de estado de la enfermedad de Sandhoff (1 -2 años de edad).

Las secuencias fotográficas siguen mostrando individualmente, a distintos afectados de la casuística argentina.

Posición de batracio, total desconexión del medio circundante. Ceguera, La gran hipertrofia gingival a las pestañas muy largas, suelen ser otros síntomas, prácticamente constantes.

Continuación figura 2.2.



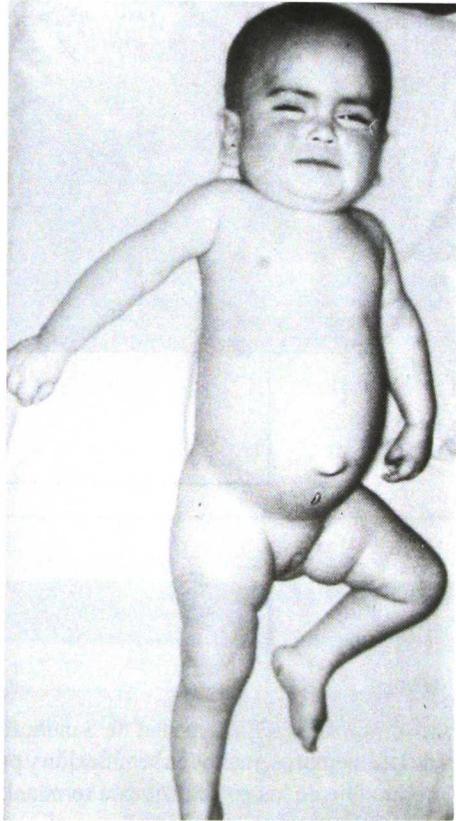
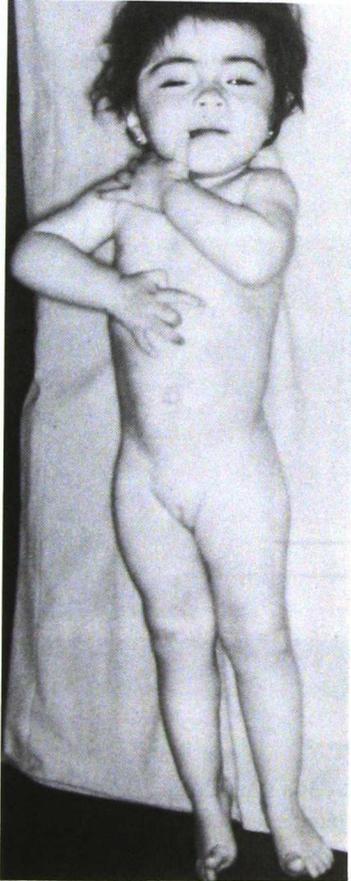


Fig. 2.3. Arriba: respuesta extensora a un estímulo auditivo externo. Abajo izquierda: marcada espasticidad; miembros inferiores en extensión y miembros superiores en flexión. Babinski espontáneo. Abajo derecha: macrocefalia y hemiparesia espástica derecha.

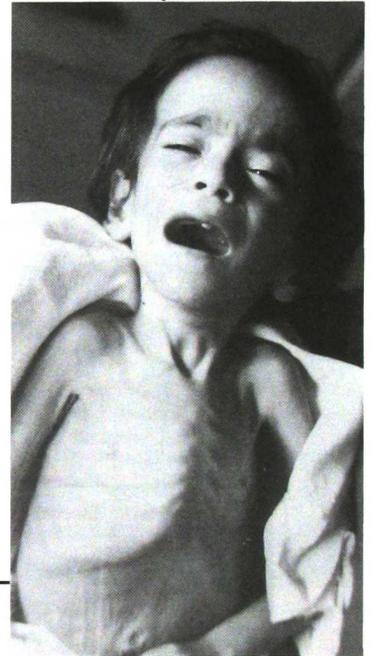
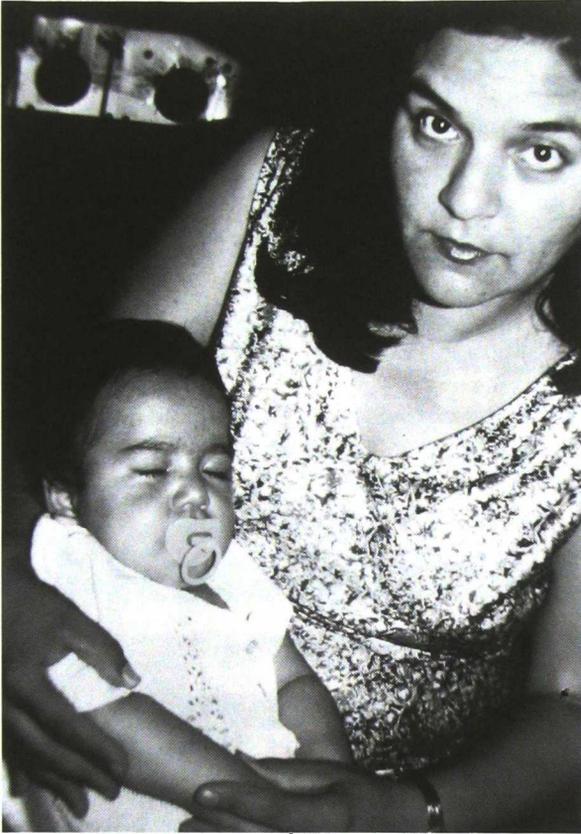
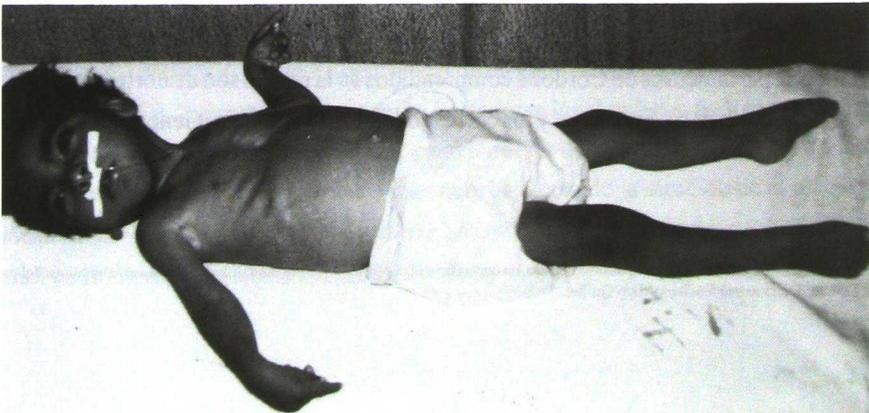
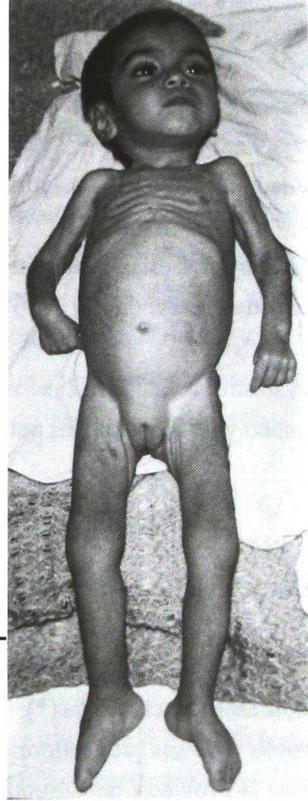
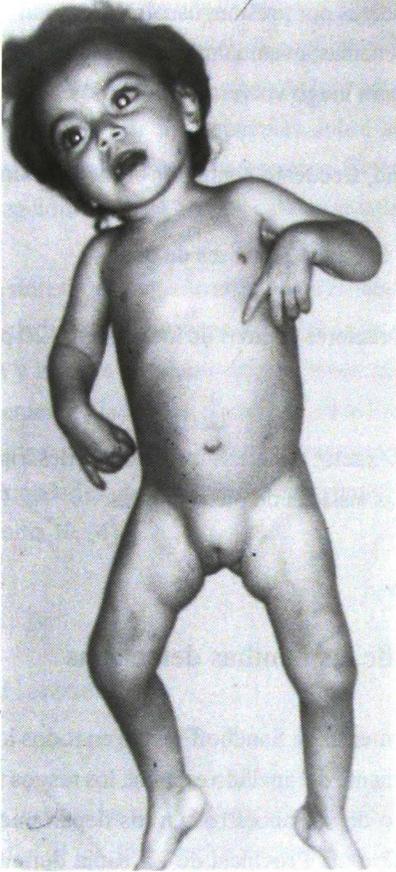


Fig. 2.4. Fase terminal en la Enfermedad de Sandhoff (12 - 36 meses de edad). Hipertonías de los miembros, manos en semiflexión y pronación, miembros inferiores en extensión con equinismo irreductible de los pies. Caquexia terminal. El paciente que se presenta en una sola fotografía, arribó a la consulta en este período final de la enfermedad.

Continuación figura 2.4.



A medida que la enfermedad progresa, el manejo médico, sólo paliativo, se torna más dificultoso. El niño debe ser alimentado por sonda nasogástrica por dificultad en la deglución; los bronquios se llenan de secreciones que deben ser permanentemente aspirados; los cambios de posición en la cama deben ser muy frecuentes para evitar o disminuir las escaras por presión; usualmente el niño se torna constipado pertinaz lo cual obliga a la evacuación por enemas; eventualmente presenta convulsiones que responden en el inicio a los anticonvulsivos para luego volverse refractarios.

El paciente muere entre el año y tres años de edad, frecuentemente por bronconeumonía.

La edad promedio de la mayoría de las muertes, fue a los 24 meses de edad.

En la **Tabla 2.1** están señalados los principales caracteres clínicos de los primeros 20 pacientes con Enfermedad de Sandhoff (17).

La casuística actual, de 62 niños con diagnóstico exacto, mantiene invariable la descripción del cuadro clínico y no difiere de las notadas en casuísticas aisladas de otros lugares.

II.2.2 Características étnicas y procedencia de las familias detectadas

El estudio de los niños afectados de Enfermedad de Sandhoff reveló en todos los casos, salvo uno, la ascendencia criolla (*), inferido principalmente del apellido español, los rasgos mestizos del probando y de sus progenitores y el afincamiento de sus ancestros en los departamentos del noroeste de la Provincia de Córdoba y zona limítrofe de la Provincia de La Rioja durante tantas generaciones como recordaban las familias involucradas (Fig 2.5). Sólo una niña procedente de Brinkmann, Departamento San Justo, Córdoba, resultó descendiente de italianos por ambas ramas paternas.

Los cinco departamentos de Córdoba comprendidos en la región son de norte a sur, Cruz del Eje, Minas, Pocho, San Alberto y San Javier y los correspondientes a La Rioja: General Belgrano y General Ocampo.

(* "criollo": con varias generaciones de antepasados nativos, en consecuencia conformado por la modalidades y usos característicos del país. (Uruguay y Argentina). Fuente: Diccionario Enciclopédico Quillet.

De los datos histórico - geográficos obtenidos, estimamos que en esta población criolla el factor geográfico fue de primordial importancia. La región del noroeste de Córdoba, denominada en la antigua nomenclatura popular, el Valle de Traslasierra, se caracteriza en líneas generales por una alta zona montañosa al este y una llanura occidental que se continúa con los llanos de La Rioja. Esta especial topografía y la falta de medios de comunicación accesibles a los habitantes, mantuvo en aislamiento a los modestos poblados, muchos de los cuales, como Soto, San Marcos, Nono y San Carlos Minas fueron fundados por los españoles sobre antiguas comunidades indígenas, pronto asimiladas y conformadas cual un grupo homogéneo. El ferrocarril atravesaba tangencialmente la zona, de allí que la localización de otros grupos casi no existió, salvo en Villa Dolores y Mina Clavero.

En síntesis, el pequeño número de fundadores, la escasa afluencia posterior de extranjeros, el alto número de hijos, el afincamiento en el lugar durante varias generaciones y el aislamiento en el que vivieron y aunque en menor escala, viven aún muchos de esos pequeños poblados, dio lugar muy probablemente a la inusual frecuencia de la Enfermedad de Sandhoff, fenómeno semejante observado en definidas comunidades endogámicas como el 'Old Order Amish' en quienes se reconoció además de enfermedades de transmisión autosómica recesiva, otras de herencia donimante o ligadas al cromosoma X. (4).

II.2.3 Herencia

La transmisión de la enfermedad es de tipo autosomal recesiva. En la Fig 2.6, se muestra la hermandad de los 36 primeros pacientes de la Enfermedad de Sandhoff pertenecientes a 27 diferentes familias.

Desde el punto de vista clínico, el conocer la forma de transmisión hereditaria que adopta la enfermedad, es de importancia fundamental. Los padres deben contar con la información de la posibilidad de que 1 en 4 es el riesgo de ocurrencia de un enfermo con igual chance para mujeres que para varones y que 1 ó 2 de los hermanos serán portadores igual que sus padres; por lo tanto, cada hermano de un enfermo tiene una chance de 2 cada 3 de ser un portador. Sin embargo, el riesgo de esos portadores de que tenga un hijo afectado es muy bajo cuando la elección de la pareja es al azar. Esta consideración cambia radicalmente cuando se trata del asesoramiento para miembros de una comunidad como la que fuera reconocida en Córdoba.

Tabla 2.1 - Principales características clínicas de 20 pacientes con gangliosis CM, tipo 2

Familia	A	B	C	D	D	E	F	F	F	F	G	H	H	I	J	K	L	L	M	N	O
Nº de hijos afectados/total	1/2	1/3	1/1	2/3	2/3	1/6	2/3	2/3	2/3	1/2	1/4	1/2	1/2	1/2	1/2	1/3	2/3	2/2	1/2	1/1	1/3
Sexo	M	F	F	F	M	F	F	M	F	M	F	F	M	M	M	F	M	M	M	F	F
Origen étnico	C	I	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
Edad de comienzo clínico en meses	7	8	6	5	4	6	4	?	6	8	1½	?	?	6	3	7	8	8	6	6	6
Edad de muerte en meses	17	21	15	13	15	?	15	11	18	17	vive	18	14	21	22	32	29	34	19	?	?
Deterioro psicomotor	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Convulsiones	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Respuesta extensora a ruidos	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Hipotonía axial	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Hipertonía de miembros	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Hiperaflexia profunda	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Mancha cereza	+	+	+	+	+	+	+	?	?	?	+	+	+	+	+	+	+	+	?	+	+
Facies inexpresiva	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Rebote alveolar engrosado	+	+	+	+	?	+	+	?	?	+	+	?	+	?	?	+	+	?	?	+	+
Macrocefalia	0	0	+	+	?	+	0	?	?	0	0	?	+	?	0	+	+	0	0	0	0
Hepato-esplenomegalia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	+	0	0	0	0
E.C.C. anormal	+	0	0	?	?	0	?	?	?	0	0	?	+	+	0	0	0	0	0	?	?
Enxamético	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8 Clínico genético																					
8 Bioquímico																					
8 Histopatológico:																					
Optica																					
Ultraestructural																					

Referencias: C, criollo; I, italiano; +, presente; 0, ausente; ?, no consignado; *, determinación efectuada por el Dr. Néstor Chamoles (Buenos Aires).

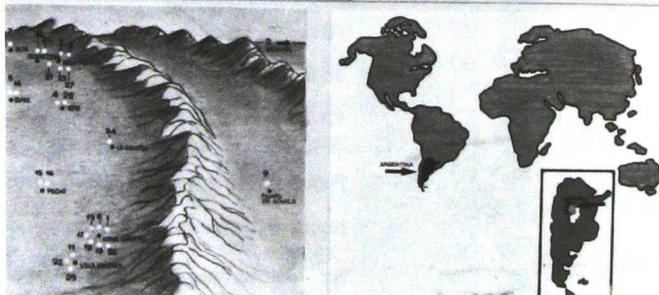
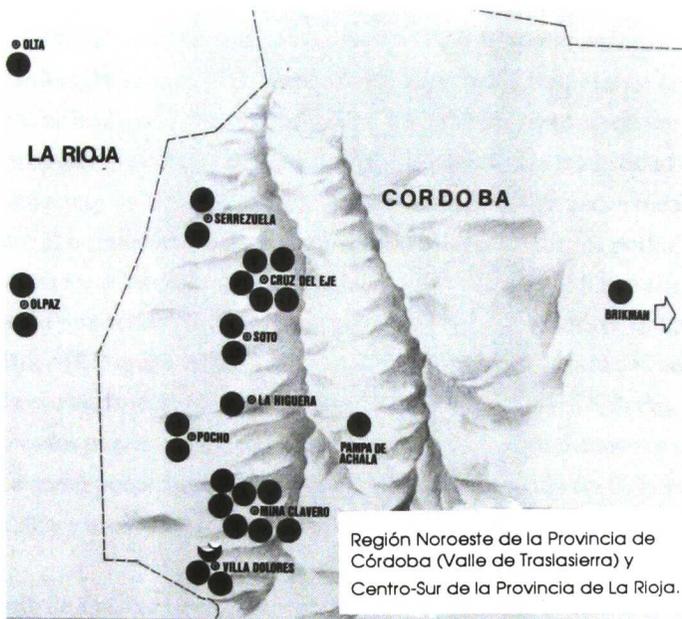


Fig. 2.5. Distribución geográfica de las 27 familias que dieron origen a los 36 primeros casos de Enfermedad de Sandhoff en Córdoba, Argentina

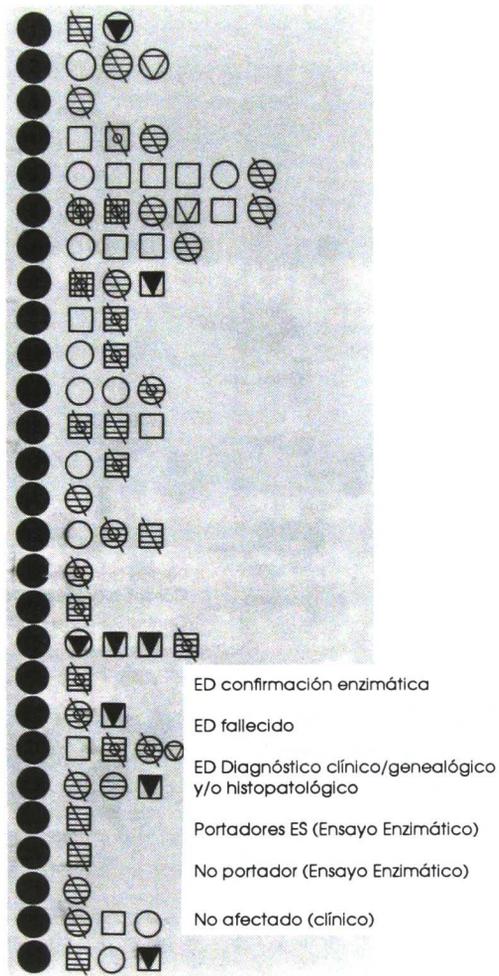


Fig. 2.6. Distribución entre la Hermandad de los 36 primeros probados reconocidos con Enfermedad de Sandhoff (ES) en 27 familias, una sola de las cuales, la número 2, era de ascendencia italiana.

II.2.4 Ensayos Enzimáticos

La medición de la actividad de la HEX (β -D-N-acetilglucosaminidasa) fue realizada mediante el empleo de sustratos artificiales, derivados piranosidos de la 4-metilumbelliferona (método fluorogénico) y / o del p-nitrofenol (método fluorogénico) (17). Una deficiencia prácticamente completa de la enzima (HEXTotal, HEXA+HEXB) fue comprobada en los homocigotos enfermos; las actividades enzimáticas en los padres (heterocigotos obligados), hermanos y controles sanos de los 36 primeros pacientes se muestran en las Figs. 2.7 y 2.8. Asimismo, el fraccionamiento isoenzimático por el calor, permitió definir la proporción porcentual de la HEXB en porcentaje de la actividad total de la HEX. (Fig. 2.9). Hasta este punto de los resultados, lo inusual o al menos con peculiaridades previamente no descritas, resultó el comportamiento de la actividad enzimática entre los portadores: en algunos casos una actividad mayor a los 500 nanomoles / ml de plasma ó suero/ h con superposición a los valores controles, cifra que resultó superior a la reconocida por otros autores en iguales grupos, en particular la de O'Brien (81) quien señaló 278, Suzuki (104) 358 ± 22 y hasta 380 nanomoles / ml/hs por Vidailheit (108); el otro aspecto fue la dispersión de los valores de la HEXB (Fig. 2.9); esto difirió de los valores observados por Suzuki (104) en 4 heterocigotos y los estudiados por O'Brien (81) los cuales lo expresaron como porcentaje de HEXA una definida proporción del 80% y 67% respectivamente, es decir un 20% y un 33% de la actividad de la HEXtotal correspondería a la HEXB

El primer intento de analizar estos hallazgos, en los heterocigotos argentinos, fue el de reunirlos en grupos diferenciados según fuera el porcentaje de HEXB en relación a la HEXtotal. (Fig 2.10).

I : HEXB, 18% - 30% de la HEXtotal

II : HEXB, 30% - 40% de la HEXtotal

III : HEXB, 40% - 65% de la HEXtotal

IV : HEXB (% de la HEXtotal) con diferencias mayores al 10% entre ambos miembros de una pareja de portadores.

A partir de estas primeras observaciones, emergió la necesidad de investigaciones más exhaustivas de los heterocigotos, tema que pasó a ocupar una especial atención en los últimos tres años. El comentario respectivo se encontrará en la sección 2.12.

También fueron ensayados una serie de otras enzimas lisosomales tanto en suero sanguíneo como en pellas leucocitarias de enfermos, heterocigotos y de sujetos controles sanos (Fig. 2.11).

El objetivo de estas experiencias estuvo dirigido a) observar las variaciones que secundariamente se producen en la Enfermedad de Sandhoff y en cierta forma obtener datos útiles para correlaciones

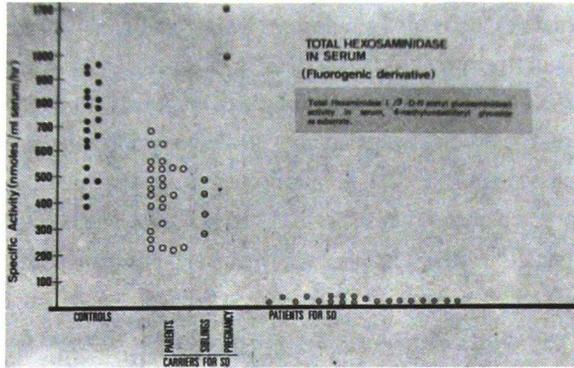
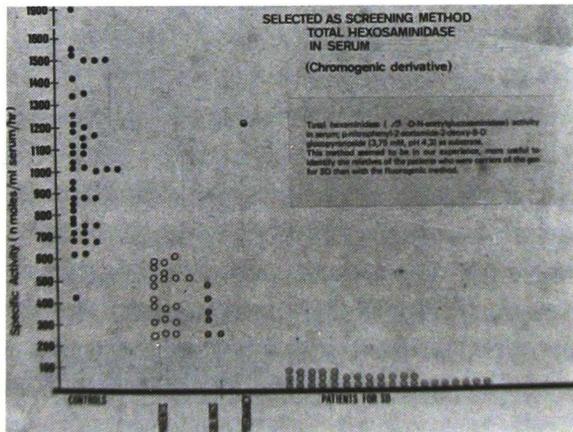


Fig. 2.7. Determinación de la HEXtotal en homocigotos y heterocigotos de la Enfermedad de Sandhoff por el método fluorogénico.



2.8. Determinación de la HEXtotal en homocigotos y heterocigotos de la Enfermedad de Sandhoff por el método cromogénico.

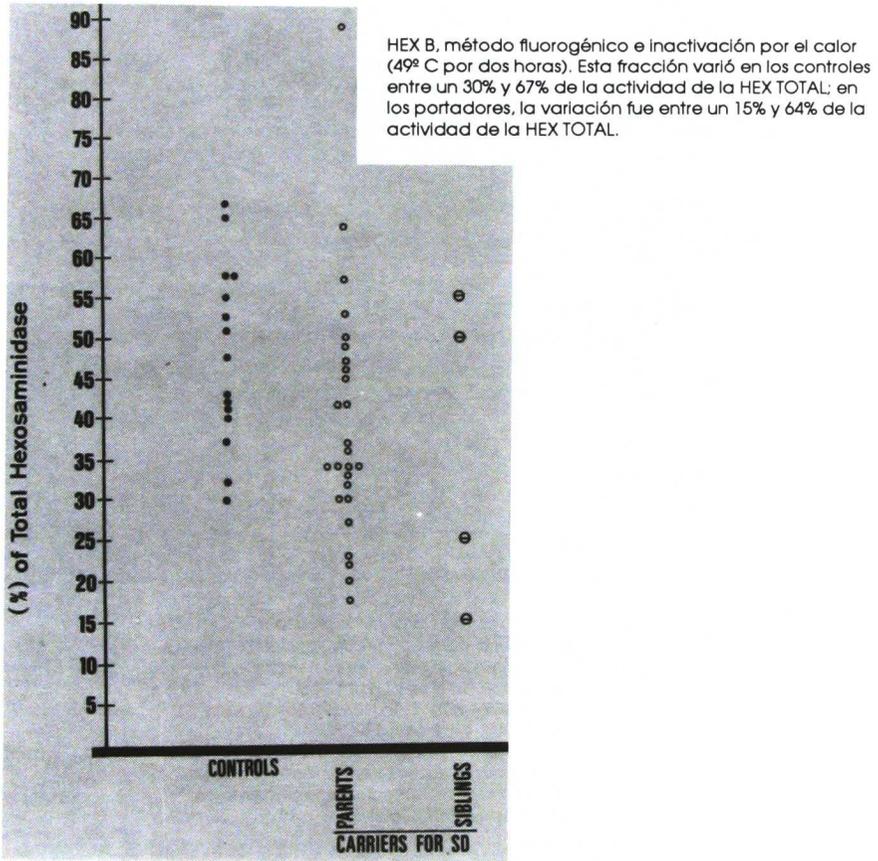
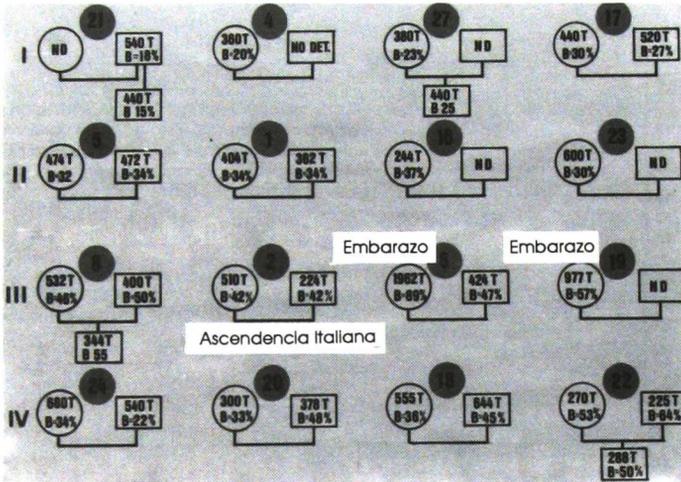


Fig. 2.9: Porcentaje de la HEX B en suero de controles normales, homocigotos enfermos y heterocigotos de la ES



La amplia variación de la actividad de la HEX B en las diferentes familias, permitió una distribución tentativa según su porcentaje en los siguientes tres grupos:

- I HEX B, 18% - 30% de la HEX TOTAL
- II HEX B, 30% - 40% de la HEX TOTAL
- III HEX B, 40% - 64% de la HEX TOTAL

Un IV grupo, emergente de los tres anteriores, marcó otro hallazgo: una diferencia de más del 10% de la actividad de la HEX B entre ambos miembros de una determinada familia.

Fig. 2.10. Distribución por familias de las actividades de la HEX TOTAL (B-D-N-acetilglucosaminidasa) (T) y el respectivo porcentaje de la HEX B (termo-estable a 49°C por dos horas) en suero sanguíneo de heritrocitos obligados (padres) y hermanos portadores de ES. Método fluorogénico con el empleo de 4-metilumbelliferilglucósido como sustrato.

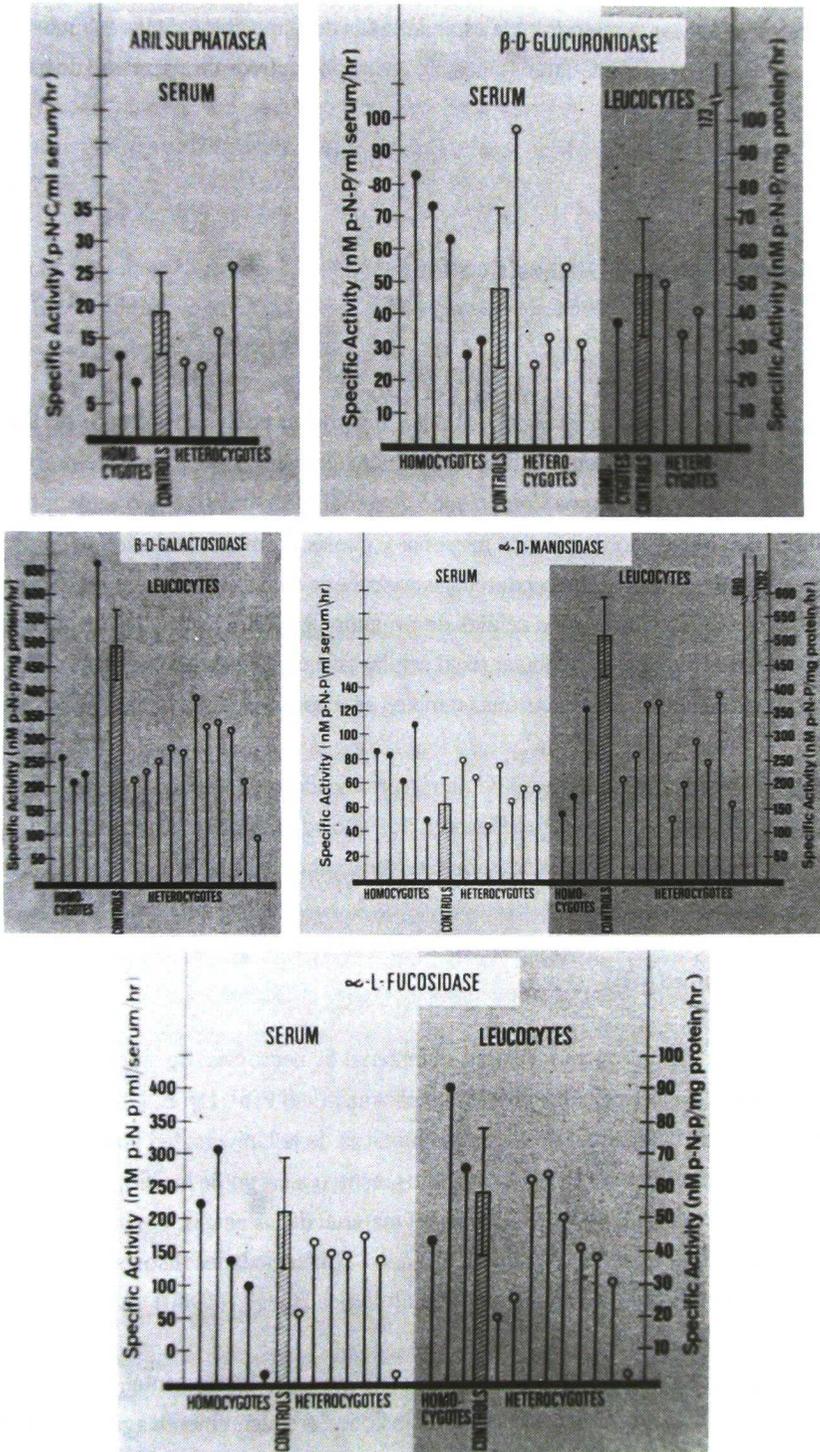


Fig. 2.11. Ensayos enzimáticos en suero y leucocitos de diferentes enzimas hidrolíticas lisosomales en pacientes con Enfermedad de Sandhoff, heterocigotos y controles normales.

fisiopatogénicas y b) aplicar la metodología estandarizada de la medición de las enzimas lisosomales en todos los procesos neurodegenerativos y no solo en los presuntivos de algún tipo de lisosomopatía o mucopolidosis (114).

II.2.5 Patología. Óptica y Ultraestructural

Microscopía Óptica (MO)

Los exámenes de la corteza cerebral por MO, mostraron el clásico aspecto de las neuronas triculares, donde el citoplasma distendido por el producto de la sobrecarga, rechazaba el núcleo hacia la periferia. (Fig. 1.2). Macrófagos conteniendo material PAS-positivo y/o sudanofílico fueron numerosos, con variable grado de pérdida neuronal y gliosis. También inclusiones lipídicas fueron frecuentemente notadas en las células endoteliales vasculares de la corteza cerebral. Gránulos PAS-positivos fueron notados en diferentes células de órganos viscerales como hepatocitos, células de Kupffer, histocitos del bazo, epitelio tubular renal, células acinares pancreáticas y células del endotelio vascular. En el plexo mientérico las neuronas también se mostraban distendidas (Figs. 2.12, 2.13).

Los exámenes histopatológicos por MO fueron practicados por los Dres. V. Torres y H. Villada del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital de Niños de Córdoba y por la Dra. J. Risco, del Servicio de Anatomía Patológica de la Maternidad Nacional de Córdoba.

Microscopía Electrónica (ME)

Los exámenes se efectuaron en muestras de material de necropsia, de biopsias de conjuntiva y de biopsias de encías. La ejecución de la ME fue realizada por el Prof. Dr. E. Hliba, de la Cátedra de Anatomía Patológica de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Córdoba; el Dr. N. Baittein, oftalmólogo del Hospital de Niños, estuvo a cargo de las biopsias conjuntivales y la Dra. P.K. de Hidalgo, odontopediatra, obtuvo el material de las encías, como parte de su trabajo de Tesis de Doctorado, bajo mi dirección titulado "Enfermedades lisosomales y afecciones neurodegenerativas hereditarias. Correlación Bio-Patológica Bucal" (1980).

Los hallazgos en la corteza cerebral se caracterizaron en lo fundamental, por presentar en el citoplasma de las neuronas una gran cantidad de inclusiones, frecuentemente agrupadas (Fig. 2.14);

la mayor parte de ellas presentaron los típicos cuerpos membranosos citoplasmáticos (CMC) constituidos por láminas concéntricas como catáfilas de cebolla, dispuestas alrededor de una parte central de densidad variable. Además se observaron otros cuerpos laminares de membranas paralelas, por lo general dispuestas en forma perpendicular al eje mayor de la inclusión y conocidos como cuerpos de zebra (CZ).

Un tercer tipo de inclusiones, presentes sobre todo en los astrocitos, de aspecto polimorfo y siempre limitados por una membrana única, con inclusión de material muy denso a veces, otras menos denso hasta tener apariencias vesiculares.

La ME de conjuntiva y de gíngiva mostró una gran cantidad de vacuolas muchas veces confluentes en las células basales del epitelio. En las capas adyacentes se observaron gran número de inclusiones, limitadas por una membrana única y de contenido finamente granular, con algunas estructuras laminares en forma de CZ (Fig. 2.15). En el estroma, los fibroblastos presentaron distensión de sus citoplasmas por múltiples vacuolas, igualmente en las células perivasculares como en las células endoteliales de los capilares sanguíneos. Estas inclusiones también presentaron matriz fibrillo-granular y pequeñas formaciones laminares en forma de CZ.

La experiencia lograda con las biopsias de conjuntiva y gingival tiene para nosotros en la actualidad, una significación diferente que al principio de esta investigación cuando la utilizábamos para establecer una estricta correlación de los diferentes parámetros diagnósticos. Como procedimientos inocuos, mínimamente agresivos, estos estudios son importantes procedimientos de orientación de los estudios para aquellas patologías sospechosas de atesoramiento lisosomal sin marcadores bioquímicos o enzimáticos de rápida orientación. A título de ejemplo, persistimos durante casi 7 años de llegar a identificar la Enfermedad de Salla o Sialuria Tipo Finlandés, (15) gracias a la guía que nos ofreció la ME de las biopsias conjuntivales y de gíngiva que demostraron indiscutibles signos de atesoramiento lisosomal.

II.2.6 Análisis Químico

En las Fig. 2.16 se observa en el Panel A un cromatograma con marcado incremento del gangliósido GM₂ extractos de cerebro e hígado de un paciente con Enfermedad de Sandhoff y en el Panel B un cromatograma de los oligosacáridos urinarios característicos de esta patología, con

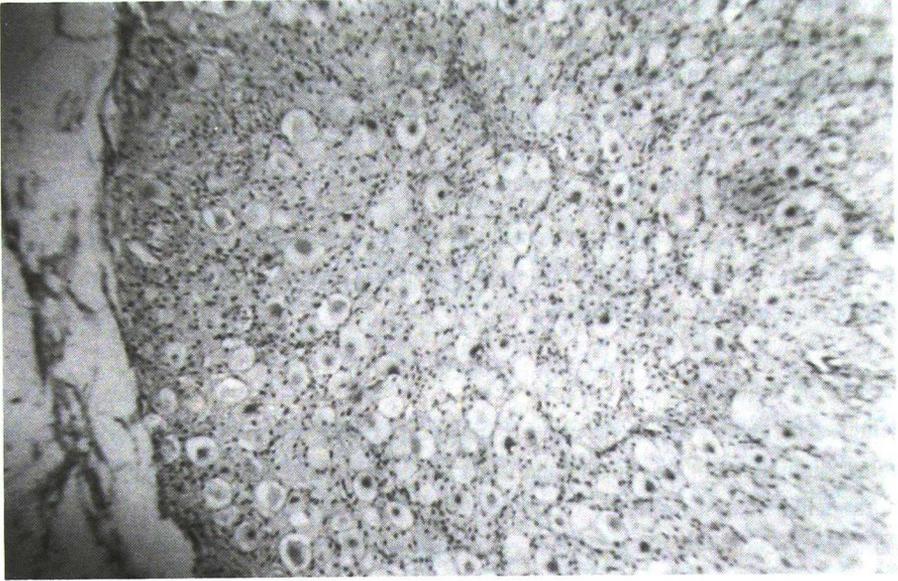


Fig. 2.12. Microfotografías ópticas de ganglio simpático (A) y de cápsula suprarrenal (B) en la Enfermedad de Sandhoff. Células hinchadas con desplazamiento nuclear por el acúmulo lipídico. Hematoxilina-eosina. Magnificación 1X400. (Patólogo: Doctor Valeriano Torres).

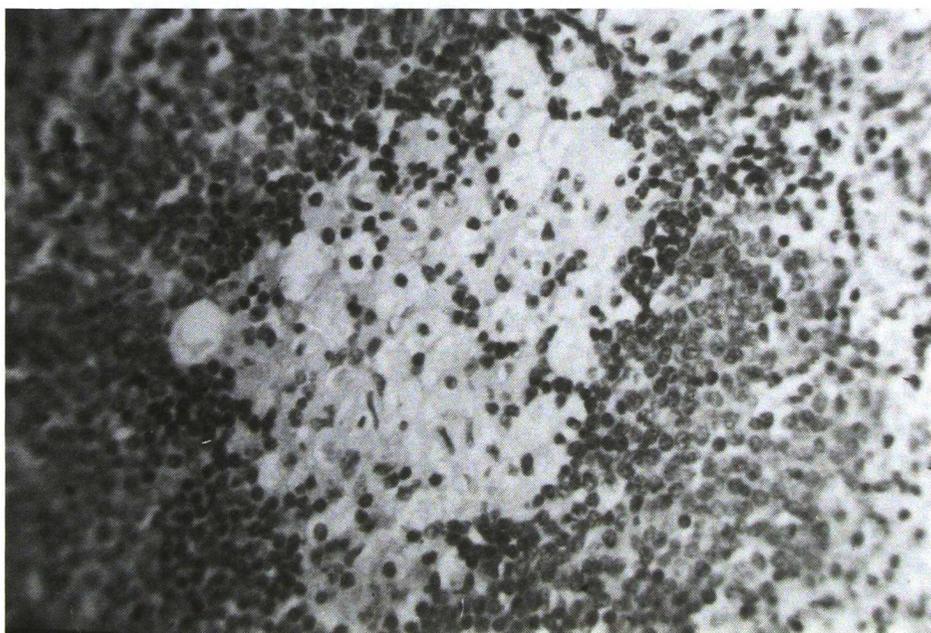


Fig. 2.13. Microfotografías ópticas de bazo en la Enfermedad de Sandhoff. A: células turgentes tomando configuración de grandes acúmulos en la pulpa blanca y B: a mayor aumento claro desplazamiento del núcleo celular y presencia de vacuolas de diferentes tamaños. Magnificación 100X y 400X, respectivamente. Tinción Hematoxilina-eosina. (Patólogo: Doctor Valeriano Torres).

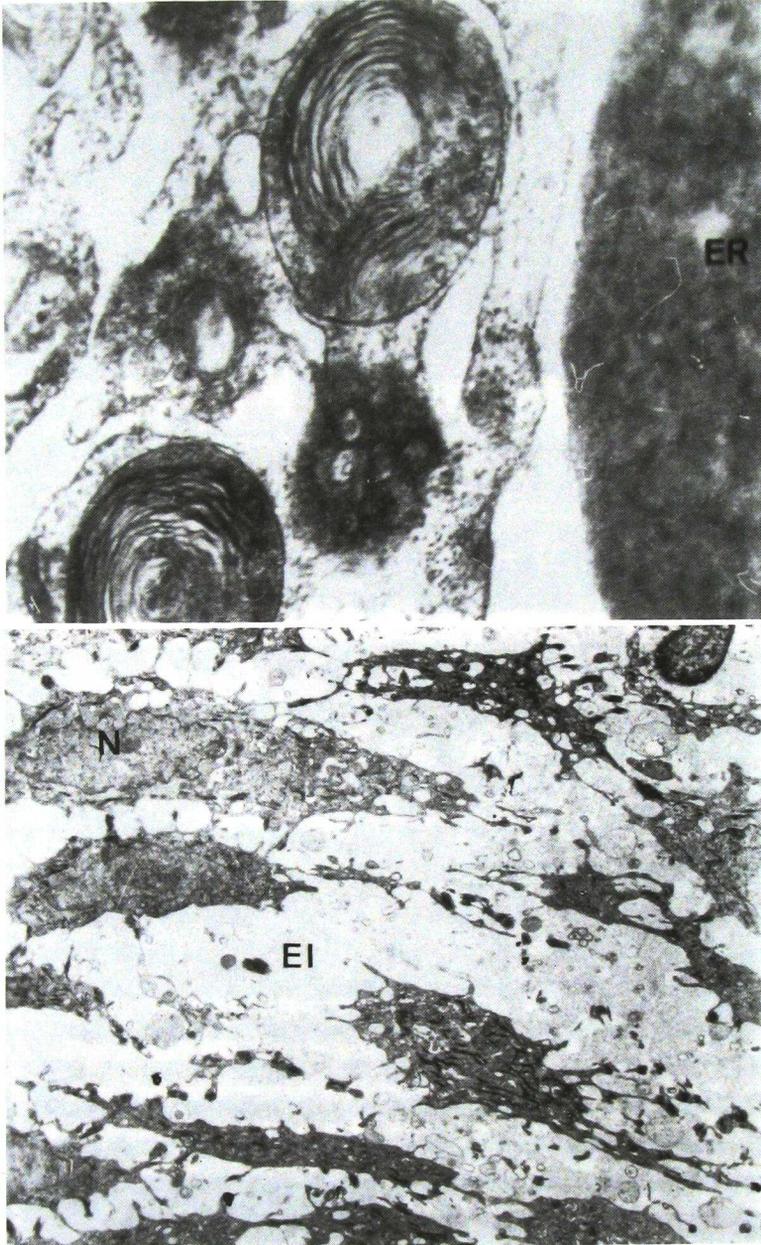


Fig. 2.14. Microscopia Electrónica de Corteza Cerebral: a y b inclusiones laminares concéntricas o cuerpos membranosos citoplasmáticos (CMC) cuerpos de zebra (CZ) e inclusiones granulares (IG), rodeadas individualmente por una membrana única del citoplasma de una neurona; c, inclusiones intracitoplasmáticas en tres periodos distintos de formación: amorfo, CZ y CMC; d, cuerpos laminares e inclusiones granulares y vesículas dentro de voluminosas inclusiones astrocitarias osmófilas. Magnificación original 30.000X. (Patólogo: Profesor Doctor Ernesto Hliba, Universidad Nacional de Córdoba).

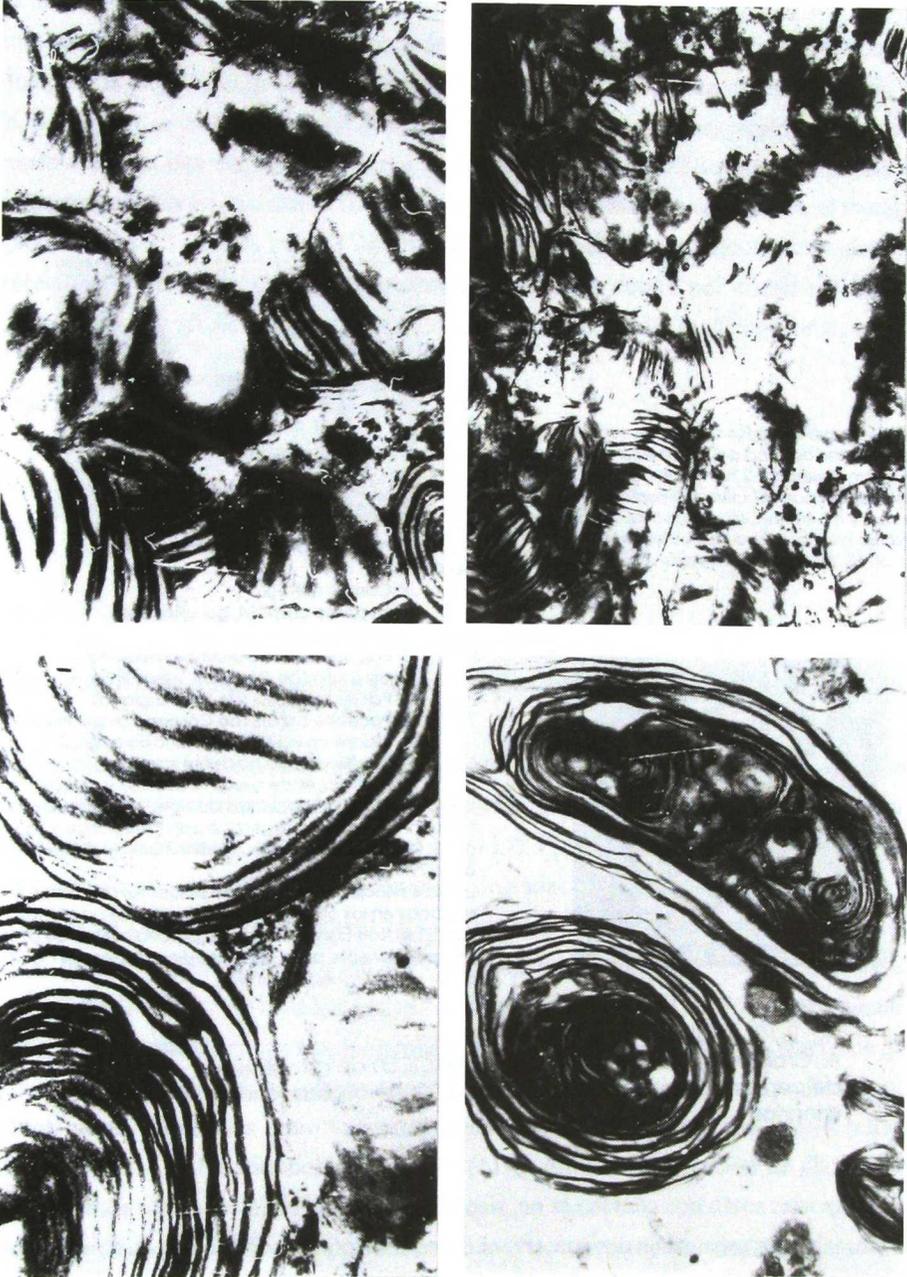
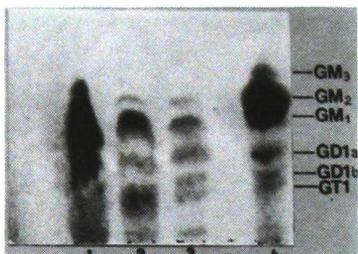
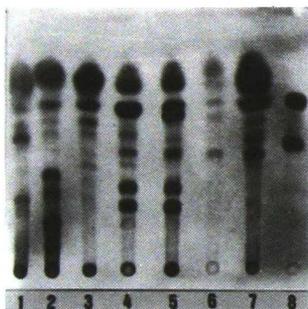


Fig. 2.15. Microscopia Electrónica de Corteza Cerebral: a y b, inclusiones laminares concéntricas o cuerpos membranosos citoplasmáticos (CMC), cuerpos de zebra (CZ) e inclusiones granulares (IG), rodeadas individualmente por una membrana única dentro del citoplasma de una neurona; c, inclusiones intracitoplasmáticas en tres períodos distintos de formación: amorfo, CZ y CMC; d, cuerpos laminares e inclusiones granulares y vesiculares dentro de voluminosas inclusiones astrocitarias osmófilas. Magnificación original 30.000X. (Patólogo: Doctor Ernesto Hliba, Universidad Nacional de Córdoba).

Mixtura de gangliósidos cerebrales sembrados sobre placas de sílica gel G, sistema de solventes cloroformo-metanol-2.5 N HONH₄ (60:35:8 v/v) Visualización con reactivo de resorcinol. Líneas 1 y 4 pertenecen a extractos de la corteza cerebral de material de autopsia de dos pacientes con ES. Nomenclatura según Svennerholm (6).



Las líneas representan oligosacáridos urinarios neutros de:

1. Control normal.
2. Paciente con GM₁ gangliosidosis, Tipo 2 (de New England)
3. Paciente con hipofusinosis neuronal ceroidea (de Córdoba, Argentina).
4. Paciente con ES (de New England).
5. Paciente con ES (de Córdoba, Argentina).
6. Madre de paciente 5. Portadora de ES.
7. Madre de otro paciente con ES.
8. Estándares de neuraminactosa y maltotriosa.

Los estudios de los pacientes de New England y la reafirmación de paciente argentino con ES fueron realizados por E. Kolodny, EKS Center, Massachusetts, Diciembre de 1979.

Las dos principales bandas de pacientes (flechas) observadas en los oligosacáridos urinarios de pacientes con ES se han convertido en un procedimiento de práctica permanente para el diagnóstico diferencial con otros procesos neurodegenerativos.

Fig. 2.16. Análisis Químico:

A. Cromatografía en capa delgada (CCD) de gangliósidos de cerebro de pacientes con ES B, CCD de oligosacáridos urinarios.

idéntico modelo en un paciente argentino y otro extranjero.

Aquí también, en forma similar a las consideraciones del párrafo anterior, los extractos lipídicos utilizados para la identificación de los compuestos atesorados, se dejaron de practicar; en cambio persiste, o más aún, se ha tornado infaltable, la investigación de los oligosacáridos urinarios ya que la demostración de una excesiva excreción acompañada de específico 'pattern', brinda valiosa orientación diagnóstica en pacientes con sospecha de padecimiento o alteración en el metabolismo de las glicoproteínas (29). En la Tabla 2.2 se muestran los tipos de oligosacáridos excretados en varias glicoproteinosis o en patologías de atesoramiento lisosomal donde por causa del defecto, ej, Enfermedad de Sandhoff, se compromete también el metabolismo de las glicoproteínas.

1985 Tomas G.Warner, Raquel D.de Kremer, Eric R. Sjoberg, Amy K.Moc. The Journal of Biological Chemistry, 260 : 6194 - 6199 (112).

II.2.7 Caracterización y análisis de los N-acetilglucosamil oligosacáridos de cadena ramificada acumulados en los tejidos de la Enfermedad de Sandhoff

Las patologías por atesoramiento lisosomal debidas a específicas deficiencias de enzimas glicohidrolíticas, se caracterizan en parte, por la excreción urinaria y acumulación tisular de una amplia variedad de oligosacáridos de alto peso molecular (113). Presumiblemente, esos productos acumulados representan el remanente de la incompleta degradación de la cadena oligosacárida de las glicoproteínas séricas y tisulares sujetas al catabolismo lisosomal. El aislamiento y detallado análisis estructural de los oligosacáridos fueron realizados en varias de estas entidades, incluyendo la GM₁gangliosidosis (83, 117), α -fucosidosis (119) y α -manosidosis (118, 67). Estos estudios han provisto valiosa información acerca de los posibles mecanismos colaterales, 'pathways', de degradación de las glicoproteínas como asimismo revelaron la estructura parcial de varios glicoconjugados. En algunos casos, diferencias entre variantes clínicas o subtipos fenotípicos estuvo reflejado en marcadas diferencias en los metabolitos urinarios (119). Aunque la excreción de glicoconjugados urinarios fue analizada en varias de las glicoproteinosis, no se contaba con datos relacionados con la caracterización de oligosacáridos acumulados en tejidos viscerales o neuronales para ninguna de estas patologías.

En la enfermedad de Sandhoff se acumulan tanto el gangliósido GM₂ como oligosacáridos

viscerales y urinarios. Los glicoconjugados almacenados contienen derivados β -N-acetilglucosamil en su extremo terminal no reductor debido a la ausencia generalizada de la β -hexosaminidasa lisosomal. Varios pentasacáridos lineales como así también oligosacáridos de alto peso molecular y de cadena ramificada han sido identificados (79, 100); para estos últimos, la estructura fue establecida (Fig. 2.17) e incluyen :a) OS 4, un biantenarico hexasacárido, b) OS 5, un triantenarico heptasacárido y c) S 6, un triantenarico heptasacárido denominado biantenarico, bidiseado.

En este trabajo, se partió del supuesto que los glucosamil oligosacáridos acumulados en la Enfermedad de Sandhoff, en particular los de cadena ramificada, deberían ser de especial interés, ya que el grado de ramificación o el número de antenas sobre los oligosacáridos lactosaminicos era mediado en el proceso de biosíntesis, por la adición de residuos de N-acetilglucosamina a la cadena oligosacárida en crecimiento. Era conocido que este proceso se llevaba a cabo por lo menos por cuatro distintas enzimas del sistema de las N-acetilglucosamil transferasas, cada una de ellas empleando UDP-GlcNAc como sustrato e incorporando N-acetilglucosamina en sitios específicos y en etapas diferentes de la síntesis de la molécula oligosacárida (29).

En otros términos, la hipótesis de este trabajo implicaba demostrar en la Enfermedad de Sandhoff, que debido a deficiencia total de la HEX, el catabolismo celular de los glicoconjugados terminaba cuando un residuo N-acetilglucosamina era encontrado por la enzima catalíticamente inactiva. De modo tal, que aunque la degradación parcial de oligosacáridos posibilitaba la separación del ácido siálico, fucosa y otros restos de hidrocarbonados, el número de ramificaciones del original glicoconjugado podría ser discernido e igualmente preservarían los distintos tipos de las ramificaciones.

Distribución de los N-Acetilglucosamil Oligosacáridos en Tejidos de Pacientes de Sandhoff

Seis mayores fracciones oligosacáridas fueron identificados en algunos de los tejidos viscerales de dos pacientes argentinos (L.O. y V.C.) cuando fueron analizados por cromatografía líquida de alta resolución. Compuestos similares no fueron observados en individuos normales a iguales niveles de detección. Los oligosacáridos de cadena lineal eluyeron antes que los de cadena ramificada OS 4, OS 5 y OS 6 estos eluyeron a mayor un gradiente de concentración del buffer eluyente de la fase acuosa. En la Fig. 2.18 se muestran los perfiles cromatográficos de extractos de tejidos de L.O. y en la Tabla 2.3 se señala la distribución tisular cuantitativa de los oligosacáridos tisulares (páncreas, hígado, cerebro, riñón, bazo y pulmón) de nuestros dos pacientes, L.O. y V.C.

En síntesis, en este trabajo fueron aislados y cuantificados los N-acetilglucosamil oligosacáridos

Tabla 2.2: Carbohidratos Urinarios en Glicoproteinosis y patología Relacionadas	
Sialidosis	Sialiloligosacáridos
Fucosidosis	Fucooligosacáridos - Fucoglicopéptidos
Manosidosis	Oligosacáridos ricos en manosa y N-acetilglucosamina
Aspartilglucosaminuria	Aspartilglucosamina y otras glicooasparaginas
GM1 Gangliosidosis	Galactooligosacáridos
GM2 Gangliosidosis (Enfermedad de Sandhoff)	Oligosacáridos conteniendo N-acetilglucosamina
Mucopolidosis II (I-Cell Disease)	Moderada sialiloligosacariduria
Mucopolidosis III (Pseudopolidistofia de Hurler)	
Enfermedad de Salla	Acido Siálico libre

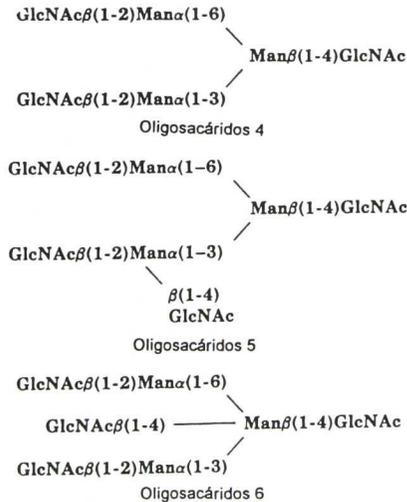


Fig. 2.17. Estructuras de tres abundantes oligosacáridos de cadena ramificada acumulados en la Enfermedad de Sandhoff (112).
GlcNAc, 2-acetoamido-2-deoxi-D-glucosa; Man, D-manosa.

Tabla 2.3. Distribución tisular y cuantificación de oligosacáridos de cadena ramificada en la Enfermedad de Sandhoff. [Pacientes L.O. y V.C. procedieron de Córdoba, Argentina. Y T.C. era de Toronto, Canadá.]

Tejido	N-acetilglucosaminiloligosacárido			
	Paciente	4, biantenarico	5, triantenarico	6, triantenarico bisectado
Páncreas	L.O.	19 ± 1	46 ± 1	20 ± 3
	V.C.	10 ± 1	17 ± 4	10 ± 1
Hígado	L.O.	9 ± 2	3 ± 1	2 ± 1
	V.C.	10 ± 1	5 ± 1	7 ± 1
Cerebro	L.O.	1.7 ± 0.4	ND(a)	12 ± 3
	V.C.	3.8 ± 0.3	ND(a)	11 ± 1
	T.C.	1.0 ± 0.4	ND(a)	8 ± 0.1
Riñón	L.O.	4.9 ± 0.7	1.7 ± 0.1	3.6 ± 0.6
	V.C.	1.1 ± 0.2	0.5 ± 0.1	3.6 ± 0.7
Bazo	L.O.	3.6 ± 0.6	0.5 ± 0.1	2.7 ± 0.9
	V.C.	1.0 ± 0.1	0.3 ± 0.1	1.7 ± 0.3
Pulmón	L.O.	3.2 ± 0.4	0.7 ± 0.2	2.2 ± 0.2
	V.C.	1.3 ± 0.5	0.4 ± 0.1	1.8 ± 0.5

(a) No detectado a la sensibilidad del estándar interno de oligosacárido y proteína concentración utilizado en la técnica general, sin embargo cuando la muestra se incrementó 10 veces, cantidades trazas fueron identificadas (112)

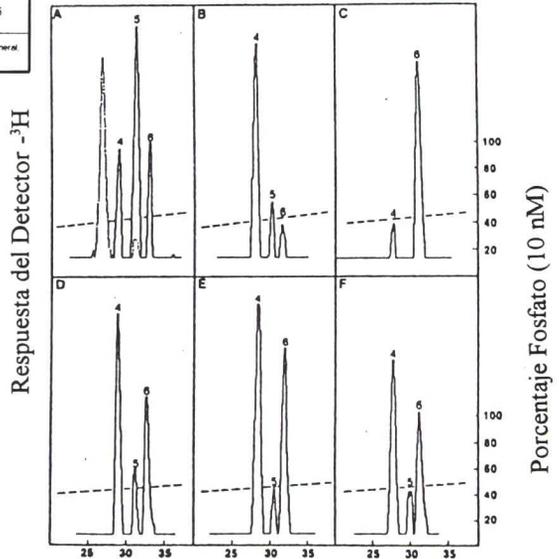


Fig. 2.18. Perfil de la elución por HPCL de los N-acetilglucosamil-oligosacáridos de cadena ramificada de tejidos en la enfermedad de Sandhoff. Los oligosacáridos fueron extraídos de los tejidos del paciente argentino L.O., convertidos en ³H-oligosacáridos-alditoles y separados sobre una columna de Micro Park AX-5 por elución a gradiente lineal de concentración progresiva de buffer fosfato 10 nM, en acetonitrilo. Las fracciones oligosacáridas fueron detectadas como cuentas radioactivas usando un defecto de centelleo líquido según descrito por Warner W, De Kremer RD y col. en "Material y Métodos" (112). Paneles: A, páncreas; B, hígado; C, cerebro; D, riñón; E, bazo; F, pulmón.

de cadena ramificada acumulados en tejidos (neural y visceral) de dos pacientes argentinos con Enfermedad de Sandhoff. Detallado análisis estructural de las tres mayores fracciones, oligosacáridas OS 4, OS 5 y OS 6 fue realizado por espectroscopía de resonancia magnética protónica.

El biantenarico bidisechado heptasacárido, OS 6, fue el más ubicuamente distribuido y el mayor componente en hígado, bazo, riñón, pulmón, páncreas y cerebro.

Este análisis indicó que las glicoproteínas conteniendo cadenas oligosacáridas biantenaricas bidisechadas son abundantes sustratos para los lisosomas en tejidos humanos; en cerebro, el OS 6 comprendió el 70% de los productos hidrofílicos acumulados. El OS 5, un triantenarico heptasacárido, tuvo una similar distribución en los tejidos viscerales, con su máximo contenido en el páncreas, pero con muy bajos niveles en cerebro. Estos resultados sugirieron que las enzimas biosintéticas GlcNAc transferasa III y IV responsables de la síntesis de estas estructuras, tienen una generalizada distribución con variable grado de expresión en las vísceras humanas y limitada expresión de la transferasa IV en el tejido neural.

1986 Tomas G. Warner, Raquel D. de Kremer, Derek Applegarth, Amy K. Mock. Clinica Chimica Acta, 154 : 151 - 164 (111).

II.2.8 Diagnóstico y caracterización de la GM2 Gangliósidos Tipo II (Enfermedad de Sandhoff) por Análisis de los N-acetil-glucosamil oligosacáridos por cromatografía líquida de alta resolución

Este trabajo consistió en una ampliación y aplicación de la metodología combinada de cromatografía líquida de alta resolución (High performance liquid chromatography, HPLC) y la espectroscopía de resonancia magnética protónica para el diagnóstico de la Enfermedad de Sandhoff y también para un análisis comparativo de los oligosacáridos urinarios en pacientes con la forma infantil de la enfermedad, argentinos y no argentinos, y pacientes con la Sandhoff juvenil, de compromiso clínico y evolutivo menos severo.

Mostración de algunos resultados

a. Análisis de los N-acetilglucosaminil OS urinarios por cromatografía en capa delgada (CCD) y por

HPLC.

Tres mayores fracciones de OS fueron detectados en la orina de ambas formas de la Enfermedad de Sandhoff, infantil y juvenil, cuando se analizaron por CCD. Sin embargo, los OS no fueron fácilmente visualizados por este método, posiblemente por la escasa concentración en las muestras analizadas o también por la poca sensibilidad del orcinol-reactivo color frente a restos de alto contenido de N-acetil hexosamina. Cuando los N-acetilglucosaminil oligosacáridos fueron convertidos en OS alditoles por el NaBH₄ y analizados por HPLC, siete fueron las fracciones obtenidas (Fig 2.19), demostrando la mayor capacidad resolutive del HPLC sobre la CCD. Además, los modelos de OS en los pacientes infantiles y juveniles fueron similares aunque cuantitativamente en los últimos, los OS fueron de 6 a 13 veces más bajos (Tabla 2.4); por otra parte, no se observaron diferencias significativas entre los pacientes infantiles, argentinos y no argentinos.

b. Análisis de los N-acetilglucosaminil OS en tejidos de pacientes con Enfermedad de Sandhoff

También siete mayores fracciones de OS fueron detectadas en los tejidos de Sandhoff. El OS 5 fue la mayor fracción en la mayoría de los tejidos, contrastando con el modelo de orina de predominio del OS 7. En general, el modelo de OS y sus cantidades relativas fueron similares de cada fracción para el bazo, pulmón, riñón, hígado y bazo (Fig. 2.20) aunque el páncreas el OS 6 fue el mayor componente. Pero en el cerebro, el modelo de OS difirió en forma muy marcada (Fig. 2.20, Tabla 2.5). En este último tejido, OS 7 fue el material predominantemente atesorado constituyéndose en el 60-70% de los oligosacáridos hidrosolubles. En adición, las fracciones de rápida elución (OS 1, 2, 3 y 4) fueron de concentración mucho menor que las fracciones de mayor peso molecular (OS 5, 6 y 7).

c. Análisis por resonancia magnética protónica los OS 1, 2, 3.

En la Fig. 2.21 se muestran los espectros de los tres OS identificados en el hígado de un paciente argentino con Enfermedad de Sandhoff. El OS 1 fue identificado como un tetrasacárido lineal conteniendo un solo residuo de N-acetil glucosamina (GlcNAc) en el extremo no reductor.

El espectro protónico del OS2 fue consistente con un tetrasacárido lineal con idéntica composición de carbohidratos que el OS1. La diferencia estuvo en la unión glicosídica de la GLcNAc terminal, β 1-4 en vez de β 1-2 como en OS 1.

La fracción OS 3 dió un espectro de resonancia magnética consistente de una mezcla de al menos dos oligosacáridos. El primer compuesto, OS3a, presentó una estructura de tetrasacárido lineal con un residuo GLcNAc terminal en unión β 1-4 a un penúltimo residuo manosa, a su vez ligado en unión α 1-6 a otra unidad de manosa. El segundo componente, OS3b, fue identificado como un pentasacárido

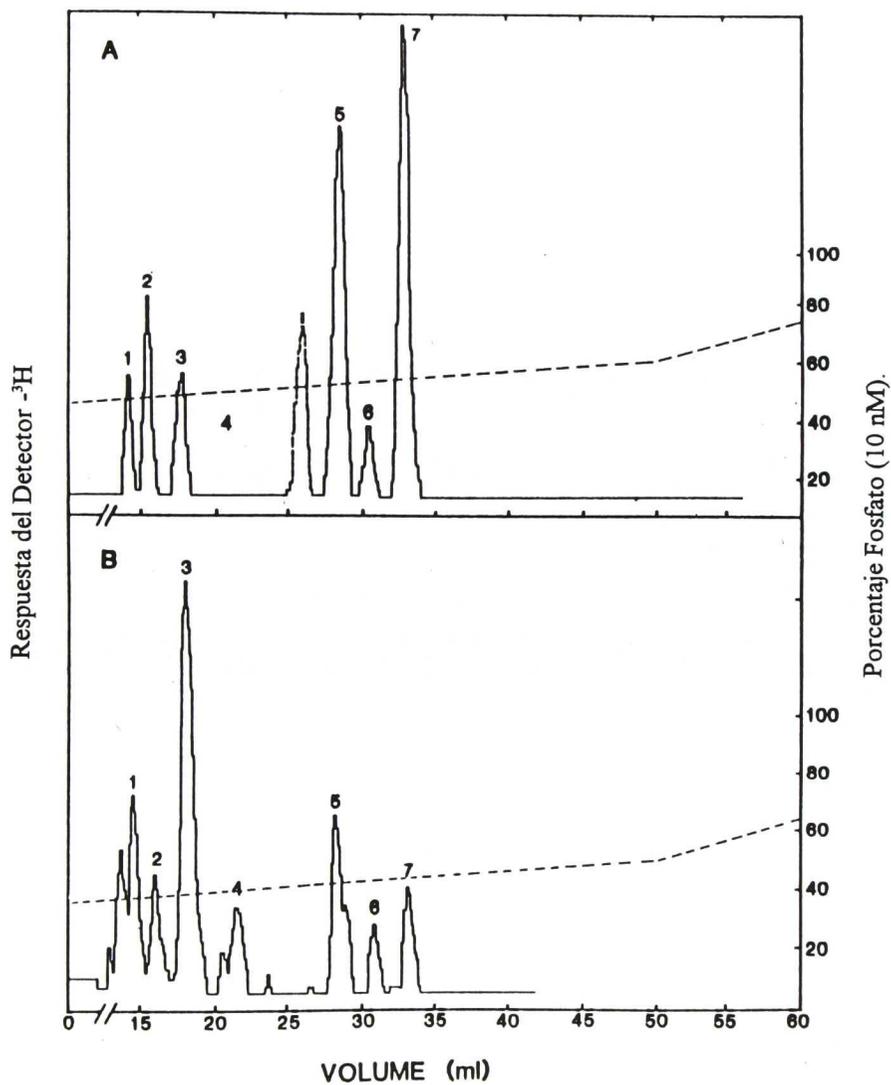


Fig. 2.19. HPLC cromatograma de N-acetil-glucosamil-oligosacáridos urinarios en la Enfermedad de Sandhoff. Panel A, Sandhoff Infantil; B, Sandhoff Juvenil.

Tabla 2.4. Cuantificación de OS urinarios en la Enfermedad de Sandhoff [a]

Origen étnico (fenotipo)	N-Acetilglucosamil-oligosacáridos (nmol/mg creatinina)						
	1	2	3	4	5	6	7
Infante Argentino (n= 5)	113 - 206 (147)	153 - 205 (178)	111 - 126 (172)	37 - 46 [b] (42)	248 - 507 (337)	68 - 109 (93)	473 - 829 (548)
Infante Americano (n= 1)	265	140	101	---	170	31	178
Infante Canadiense (n= 1)	69	62	46	16	122	80	152
Joven Canadiense M.M. (n= 2) L.W.	11	6	30	48	15	5	12
	7	6	18	12	17	5	12

[a] Los Oligosacáridos excretados en la orina de pacientes con Enfermedad de Sandhoff fueron convertidos a 3H-OS alditoles y fraccionados según descripción en "Material y Métodos" por Warner T, de Kremer RD y col. en (11). Las cantidades de cada fracción fueron relativa al estándar interna my creatinina urinaria. Son mostrados los rangos de análisis por duplicado y valores promedio (en paréntesis) con un error relativo entre ensayos del $\pm 20\%$. [b] Fracción detectada en 3 de los 5 pacientes.

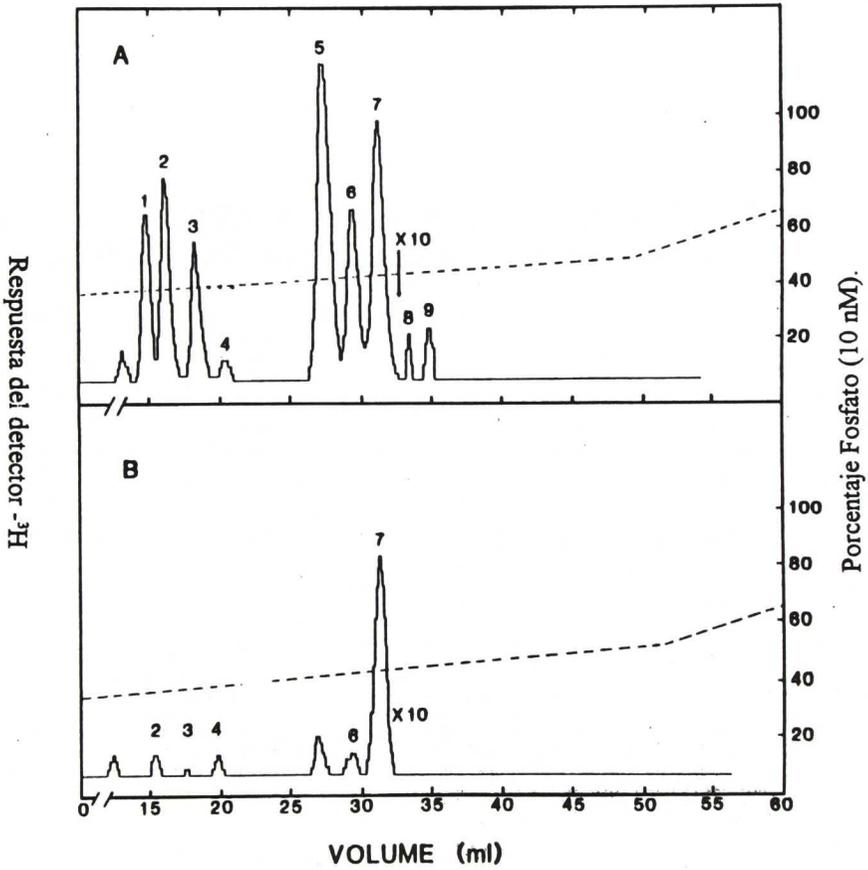


Fig. 2.20. HPCL cromatograma de N-acetil-glucosaminil OS en hígado (panel A) y en cerebro (panel B) del paciente argentino de Enfermedad de Sandhoff (L.O.). Las respuestas mostradas corresponden a 0.4 y 0.3 mg de tejido hepático y cerebral respectivamente.

Tabla 2.5. Cuantificación de OS en el Hígado y Cerebro de pacientes con Enfermedad de Sandhoff [a]

Paciente	Tejido	N-Acetilglucosamil-oligosacáridos (nmol/mg creatinina)								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
L.O. (b)	Cerebro	0.9	2.1	1.6	2.0	4.9	1.2	19.1	0.2	0.2
V.C. (b)	Cerebro	0.8	1.2	1.4	5.4	5.4	2.1	17.0	0.4	0.2
T.C. (c)	Cerebro	TR (d)	0.8	0.3	0.9	2.2	1.1	12.0	TR (d)	TR (d)
L.O. (b)	Hígado	2.9	5.1	2.1	TR (d)	11.8	5.0	3.4	TR (d)	TR (d)
V.C. (b)	Hígado	4.0	4.7	3.1	0.6	10.1	4.9	7.5	TR (d)	0.1

[a] Cuantificación de OS almacenados en tejidos de enfermos de Sandhoff. Los extractos fueron a partir de 10-20 mg de los tejidos, convertidos en 3H-OS aldítoles y fraccionados por HPLC según descriptos en "Material y Métodos" por Warner T, De Kremer RD y col. (111). Las cantidades de cada fracción fueron cuantificadas como cuentas radio activas relativas al estandar interno de OS y concentración proteica. Los pacientes L.O. y V.C. procedieron de Argentina, T.C. fue del Canadá. [b] Origen Argentino. [c] Origen Canadiense. [d] Niveles trazas.

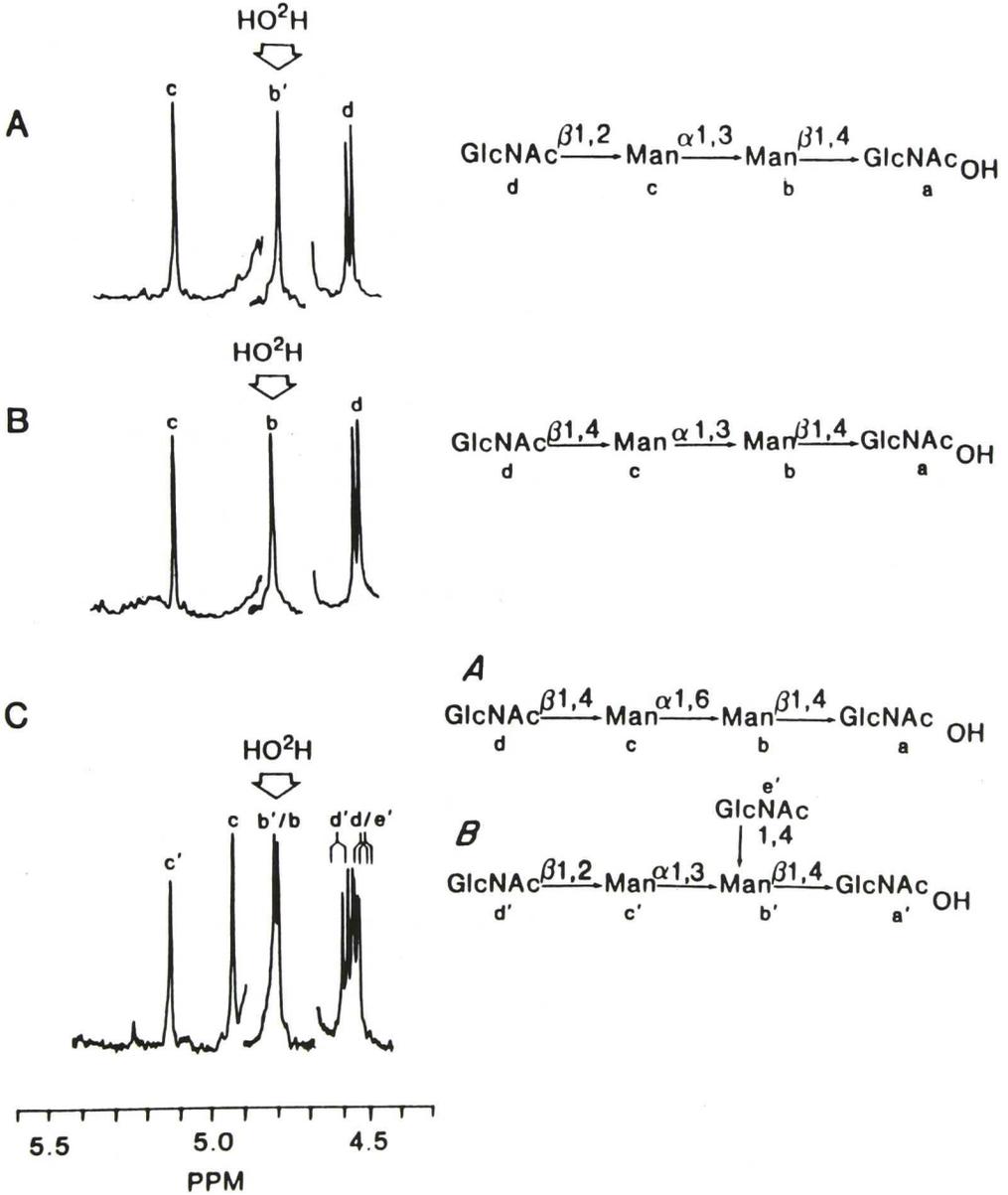


Fig. 2.21. 500MHz espectro de resonancia magnética de -1H de OS 1, 2 y 3 aislados del hígado de enfermos de Sandhoff. Panel A: espectro del OS alditol -1; Panel B: espectro del OS alditol -2. Panel C: espectro del OS alditol -3 con dos de los propuestos compuestos (A y B).

conteniendo dos residuos no reductores terminales de GLcNAc (Fig. 2.21).

El análisis estructural de las fracciones tardíamente eluidas, OS 5, 6 y 7 fue realizado con técnicas similares y relatado en detalle en (112).

En síntesis, el trabajo permitió demostrar que era posible la delimitación entre las formas infantiles y juveniles ya que estos últimos tuvieron niveles de OS urinarios 6 a 13 veces menores que las formas de comienzo precoz. Además, fue demostrado que el perfil de OS urinarios de los pacientes argentinos y el de los no argentinos de igual fenotipo eran similares. Al aunar estos resultados, se pudo colegir que los OS urinarios eran útiles indicadores de diferencias mutacionales o de heterogeneidad clínica de la Enfermedad de Sandhoff de muy marcadas diferencias en la presentación clínica. Por otro lado, el análisis de los metabolitos acumulados en el hígado, riñón, páncreas, pulmón y bazo mostraron modelos de OS similares, siendo por el contrario, marcadamente diferentes con el de cerebro. Los OS almacenados OS 1, 2 y 3 fueron similares a los OS urinarios y hepáticos identificados en otros pacientes (6-8). Aquí la mayor diferencia observada fue la identificación de un inusual pentasacárido, OS3b, previamente no reconocido entre los productos almacenados en la Enfermedad de Sandhoff. Este compuesto puede ser una glicoproteína parcialmente degradada conteniendo 'híbridas' cadenas laterales de OS. Estructuras de este tipo son formadas precozmente en la biosíntesis glicoproteínica mediante la adición de GLcNAc residuos en uniones β 1-4 a residuos manosa por la enzima UPD-GLcNAc glicopéptido β 4-N-acetilglucosaminil transferasa III. El descubrimiento de este metabolismo en el material de pacientes con Enfermedad de Sandhoff, no fue sorprendente, aunque queda por conocer si es inherente solo a los pacientes argentinos o bien no fue captado en análisis anteriores por otros autores.

El predominio de OS 7 en el cerebro permitió especular que esta estructura puede ser el OS predominante de las glicoproteínas del cerebro o bien pertenecer a una determinada glicoproteína extraordinariamente abundante en el cerebro. El OS 6 fue en cambio muy bajo en cerebro pero el más abundante producto atesorado en los tejidos viscerales, especialmente en el páncreas. Fue posible también especular que los OS acumulados en ciertos tejidos podrían ser los lugares donde inicialmente comienza la respectiva biosíntesis glicoproteínica y que existirían específicos mecanismos de regulación de la formación de OS con marcadas diferencias entre los tejidos neurales y viscerales.

1987 Raquel Dodelson de Kremer, C. Depetris de Boldini, A. Paschini de Capra, P. Pons de Veritier, H. Goldenhersch, L. Corbella, A. Sembaj, S. Martín, I. Kremer, L. Mass, J. Boscoboinik. Medicina

(Buenos Aires) 47 : 455 - 463. (45)

II.2.9 Estimación de la frecuencia de heterocigotos de la Enfermedad de Sandhoff en una población argentina de alto riesgo

La prevalencia de la Enfermedad de Sandhoff en la región se fue destacando como excepcional, aún frente a otros dos grupos étnicos casi concomitantemente descubiertos, indios norteamericanos de la comunidad de Metis de la Provincia de Saskatchewan (Canadá) con 3 pacientes y 7 casos del Líbano provenientes de un estudio retrospectivo de un período de 22 años (113).

A nuestros hallazgos previos (17, 16), se fueron agregando con posterioridad el reconocimiento de otros pacientes con Enfermedad de Sandhoff, de modo que por la época de este trabajo, 50 eran los niños con diagnóstico preciso de la entidad, pertenecientes a 42 diferentes familias, que salvo una eran, originarias del Valle de Traslasierra.

Reconocida la particular situación en la Argentina y por tratarse de un proceso irreversible, los estudios médicos debían necesariamente dirigirse a la detección de los portadores, aspecto fundamental del asesoramiento genético en las familias involucradas como igualmente única medida preventiva para la población en riesgo.

En vista a estas premisas, nos propusimos para este trabajo dos objetivos subsecuentes en su formulación: estimación de la frecuencia de heterocigotos de la Enfermedad de Sandhoff entre los individuos de la zona y elaboración de una función discriminante del genotipo por un método estadístico mediante la utilización de los valores de las actividades de la Hexosaminidasa HEXtotal (HEXA + HEXB) y HEXB de heterocigotos testigos y controles normales, a fin de su ulterior aplicación individual, principalmente en el ámbito del problema.

Para este trabajo, la descripción de los párrafos relevantes se efectuará en forma textual al de la publicación debido a la carga numérica del material empleado, la distribución grupal de los sujetos en estudio, algunas modificaciones en las técnicas de análisis enzimático y el empleo de un método estadístico,

Material y Métodos

A. Autorización de los organismos sanitarios competentes. Comunicación e información

a los servicios médicos y educacionales con jurisdicción sobre el territorio que habita la población. Extracción de las muestras de sangre y separación de los sueros a la brevedad posible; refrigeración durante el transporte y conservación a -20°C hasta su procesamiento. El estudio comprendió una muestra total de 1.568 individuos distribuidos en :

1. GRUPO REFERENCIAL: Se integró con los siguientes dos subgrupos:

a) Heterocigotos testigos: Se reunieron 53 personas pertenecientes a 5 familias de la casuística previa (17) y a otras 6 familias de pacientes diagnosticados en los últimos 3 años; 15 de estos sujetos eran heterocigotos obligados (padres), a partir de quienes se establecieron las actividades enzimáticas privativas del estado portador. Aplicado este primer parámetro a los 38 familiares restantes, 17 resultaron heterocigotos y 21 normales, constituyéndose en esa forma los 32 heterocigotos testigos de ES que acordamos como el patrón referencial autóctono. En una etapa posterior, dicho patrón fue utilizado para clasificar a los individuos del Grupo Problema.

b) Homocigotos normales: Este subgrupo se conformó con 75 sujetos sanos, sin antecedente de ES; personal médico, paramédico, estudiantes y allegados de Córdoba, Capital.

2. GRUPO PROBLEMA: Se constituyó con 1.440 individuos de ambos sexos entre 6 y 16 años de edad, que concurrían a los establecimientos escolares rurales de los 7 departamentos provinciales demarcados para el estudio, 5 de Córdoba y 2 de La Rioja y a los de las cabeceras de los departamentos de San Alberto (Cura Brochero), Minas (San Carlos Minas) de la Provincia de Córdoba y General Belgrano (Olta) de la Provincia de La Rioja. La Fig. 2.22 ilustra la distribución departamental de los lugares seleccionados para el muestro y el número de habitantes de cada uno de los departamentos abordados. La demarcación de los distritos tuvo como referencia las localidades de origen de los niños afectados. Los escolares estuvieron sujetos a controles periódicos de salud por servicios sanitarios provinciales; esta precaución se consideró aceptable ya que permitió excluir, al menos en forma general, aquellas condiciones fisiológicas o patológicas capaces de provocar variaciones importantes de la HEXA o HEXB, principalmente cuando es empleado el suero sanguíneo para los ensayos (59, 61).

B. Ensayos de la hexosaminidasa sérica: El procedimiento fluorogénico (PF) se realizó de acuerdo a O'Brien y col. (80) modificado por Kolodny (42) en la inactivación por el calor para el fraccionamiento de los componentes A y B de la HEX (49°C, 2h); sustrato empleado: 4-metilumbelliferil-2-acetamido-2-deoxi- β -D-glucopiranosido (4-MU-GlcNac). El procedimiento cromogénico (PC) se ejecutó según Hultberg y Okerman (35); sustrato empleado: p-nitrofenil- β -D-glucopiranosido (pNP-Glu). Los ensayos se efectuaron por duplicado; aquellas muestras con valores enzimáticos dentro del rango de heterocigotos, se les realizó no menos de 3 determinaciones consecutivas por duplicado.

C. Función discriminante cuadrática(FDC): se constituyó de acuerdo a la fórmula propuesta por Gold y col. (30).

Resultados

Patrón referencial autóctono: En la Tabla 2.6 se indica la conformación del subgrupo de heterocigotos testigos, la filiación a los probandos de las familias estudiadas y los valores individuales de la Hex. sérica, mediante el PF (HEXtotal y % de HEXB) y el PC (HEXtotal); respecto al patrón autóctono, sólo fueron referentes las actividades enzimáticas obtenidas con el PF.

Estimación de la proporción de heterocigotos en la población: Los 71 heterocigotos detectados constituyeron el 4,93% del total del Grupo Problema ($p=0,0493$), de manera que los límites confidenciales del 99% determinaron que el intervalo 0,0346-0,0636 contendría la proporción p y en consecuencia el porcentaje de portadores estaría entre el 6,36% a 3,46% o expresado en otros términos, habría un portador por cada 16 a 29 habitantes de la región. La Fig. 2.22 ilustra la distribución de los 71 heterocigotos detectados en los siete departamentos provinciales estudiados. El porcentaje relativo de los heterocigotos encontrados y su respectivo número de muestras fue del 4,66% para la Provincia de Córdoba (1.328 muestras / 62 heterocigotos, y del 8,03% para la Provincia de La Rioja (112 muestras / 9 heterocigotos).

Descripción estadística de las actividades de la hexosaminidasa sérica: En Tabla 2.7 se señalan los resultados de dos variables empleadas. HEXtotal(PF y PC) y el % de HEXB(PF) de los dos subgrupos referenciales, heterocigotos testigos y homocigotos normales y en forma comparada, los valores correspondientes a los 71 heterocigotos seleccionados en el Grupo Problema. Atinente a los ensayos enzimáticos con 4M-GlcNAc, los valores de las medias de la HEXtotal, como asimismo los valores de las medias de la HEXB (%) entre los dos subgrupos referenciales, fueron significativamente diferentes ($p<0,001$); en ambos subgrupos el examen de las matrices de varianzas-covarianzas, según test de Barlett (100 bis), indicó también una diferencia altamente significativa ($p<0,001$). La diferencia entre las medias de los valores de la HEXtotal y el % de HEXB entre los dos subgrupos referenciales, confirmó que era apropiado el uso de esas dos variables en una función discriminante, ya sea lineal o cuadrática. La diferencia significativa entre las matrices de covarianzas de los dos subgrupos referenciales, fue contraria al empleo de la primera como método de clasificación de los individuos, no así al de la FDC.

Procedimiento de discriminación cuadrática: Cuando a la fórmula de Gold y col. le fue aplicado el caso en análisis, resultó la siguiente discriminante:

$$Y = 2,22 T^2 - 9,12 T.P. + 14,77 P^2 - 6,66 T + 7 P - K$$

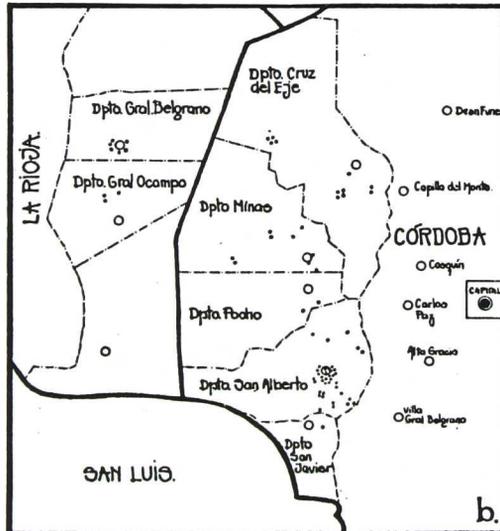
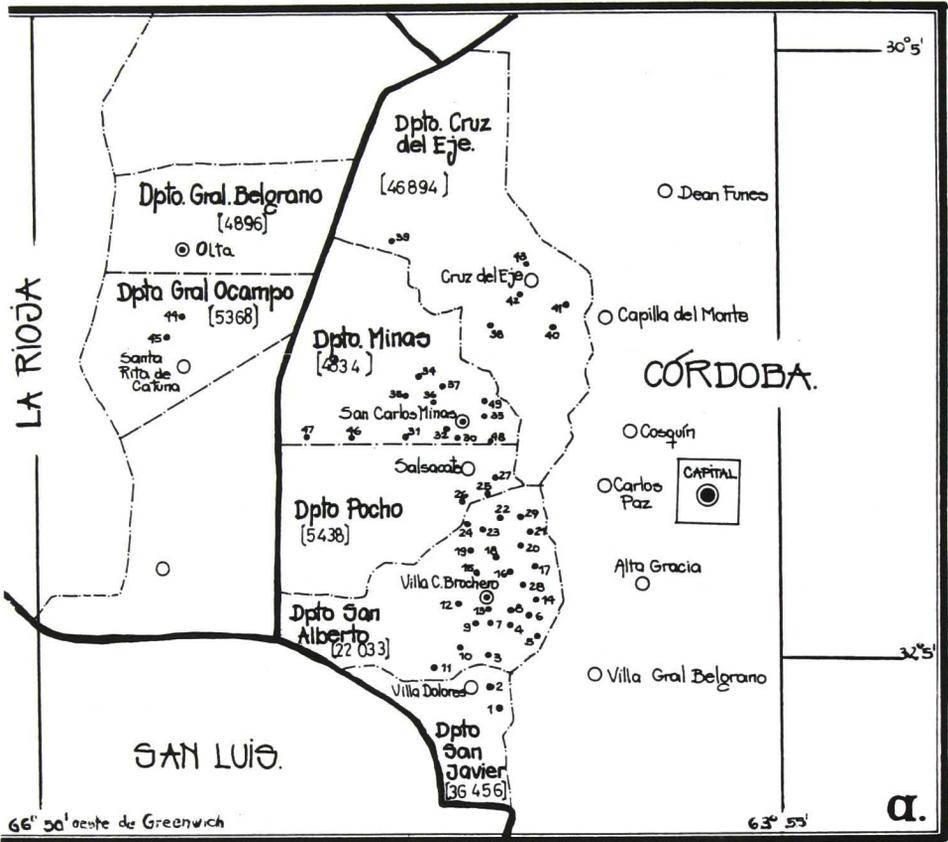


Fig. 2.22 (a) Localidades abordadas por el muestreo (*). Cabeceras de departamentales (●). Población por fdepartamento []. Población total de la reión estimada en 126.125 habitantes; (b) Distribución regional de los 71 heterocigotos entre los 1.400 escolares estudiados.

Tabla 2.6
 - Patrón referencial autóctono. Actividades
 hexosaminidásicas séricas* en el subgrupo
 Heterocigotos Testigos

Fa- milias	Paren- tesco	Sustratos artificiales		
		4MU-GluNAc-(PF)		p-NP-Gln(PC)
		Hex Total	% de B	Hex Total
A	Madre	250	32	286
	Abuela ma- terna	380	31,57	434
	Tía materna	250	24	145
B	Padre	340	20,58	364
	Madre	450	33,33	517
	Abuela ma- terna	420	19,04	542
	Tía paterna	353	19,83	362
	Tía materna	300	15,33	-
C	Padre	410	31,70	130
	Hermano	380	15,78	621
D	Padre	490	26,53	611
	Madre	330	24,24	488
E	Padre	404	33,66	-
	Madre	363	37,46	-
	Hermano	320	37,50	298
F	Hermano	250	28 ^a	290
	Abuelo pa- terno	290	24,13	-
G	Madre	450	37,77	199
	Padre	190	21,05	538
H	Madre	410	23,41	554
I	Padre	470	31,91	418
	Madre	480	33,33	695
	Abuelo pa- terno	350	31,42	534
	Abuelo ma- terno	600	23,33	-
	Tío paterno	250	16	509
	Tío materno	390	23,20	310
	Hermana	290	27,58	372
J	Abuela ma- terna	320	15,62	-
	Tía materna	230	21,73	-
K	Padre	475	24,52	360
	Madre	470	25,53	550
	Tío materno	320	18,71	331

* Valores expresados en nanomoles de sustrato hidrolizado por ml⁻¹/hora⁻¹.

siendo $T: HEX_{total}/100$; $P: HEXB/100$ y K : la constante dependiente de la probabilidad a priori qH . Para los habitantes de Traslasierra y La Rioja se adoptó una K de $-3,89$ correspondiente a qH de $0,05$, por lo cual un individuo es asignado como portador cuando el valor de Y es menor de 0 , o no portador si Y es mayor de 0 ; la probabilidad de falsos negativos para este método es de $0,01$.

La Fig. 2.23 representa gráficamente las elipses resultantes para efectuar el proceso de discriminación de portador o no entre los individuos de la región ($qH=0,05$) y para aquellos ajenos al área problema ($qH=0,003$; $K=1,82$).

Para evaluar la capacidad de clasificación de la FDC, hemos aplicado los datos de cada sujeto del Grupo Referencial y de los 71 heterocigotos, seleccionados según el patrón autóctono. Los resultados fueron: 1) todos los individuos Heterocigotos Testigos resultaron asignados a la población de portadores, es decir una sensibilidad (porcentaje de individuos heterocigotos con prueba positiva) del 100% (32/32); 2) los del subgrupo Homocigotos Normales se correspondieron a los valores de la población normal con una sola excepción, por lo tanto una especificidad (porcentaje de individuos homocigotos normales con prueba negativa) 98,67% (74/75); el Grupo Referencial presentó, en consecuencia, una proporción de erróneamente clasificados de 1/107 (1 falso positivo), y 3) para los 71 sujetos heterocigotos del Grupo Problema, hubo dos clasificados como normales, uno de ellos con un valor muy cercano a 0, o sea indicando un caso en la “zona gris” o de dudosa clasificación; incluyendo esta situación, La FDC demostró para los heterocigotos descubiertos una sensibilidad del 97,18% (69/71).

Incidencia, prevalencia y heterocigosis calculada: A 50 casos de ES en un período de 11 años con un promedio anual de 3.461 nacidos vivos en la zona, correspondió una incidencia, tasa de ataque, de 131×10^{-5} (frecuencia de 100.000 nacimientos). La prevalencia, para una población estimada en 126.125 habitantes fue de 40×10^{-5} . La proporción de heterocigosis de la región o de heterocigosis calculada de $2pq$ (donde $p=1-q$) a partir de la ley de equilibrio de Hardy-Weinberg fue del 6,99% a 3,9% de la población, es decir 1 portador por cada 14 a 26 personas.

Discusión

La estructura genética de la población ha sido abordada por Giraudo y col. (28) a través de la tipificación en el sistema HL-A; por tratarse según nuestro conocimiento, del único estudio biomédico, conviene notar no obstante, la reducida muestra de 25 individuos los hallazgos descritos como “una

Tabla 2.7

Descripción estadística de las actividades de la hexosaminidasa total (expresadas en nanomoles/ml⁻¹ de suero/hora⁻¹) y de la fracción termo-estable B (%) de los Heterocigotos Testigos, Homocigotos Normales y la de los heterocigotos reconocidos en el Grupo Problema

Sustratos.	4MU-GluNAc (PF)						p-NP-Glu (PC)		
	Hex Total			% de B			Hex Total		
	\bar{x}	R	DS	\bar{x}	R	DS	\bar{x}	R	DS
Grupo Referencial:									
Heterocigotos testigos (32)	364,8	190- 490	91,40	26,08	15,33-37,50	6,63	418,32	145- 695	147,2
Homocigotos normales (75)	705,76	300-1448	188,33	41,50	29,23-69,38	8,92	799,69	526-1894	199,49
Grupo Problema:									
Heterocigotos detectados (71)	386,95	130- 520	77,59	31,87	18,7 -40,9	11,20	579	310- 753	128,9

\bar{x} : media; R: rango; DS: desvío estándar.

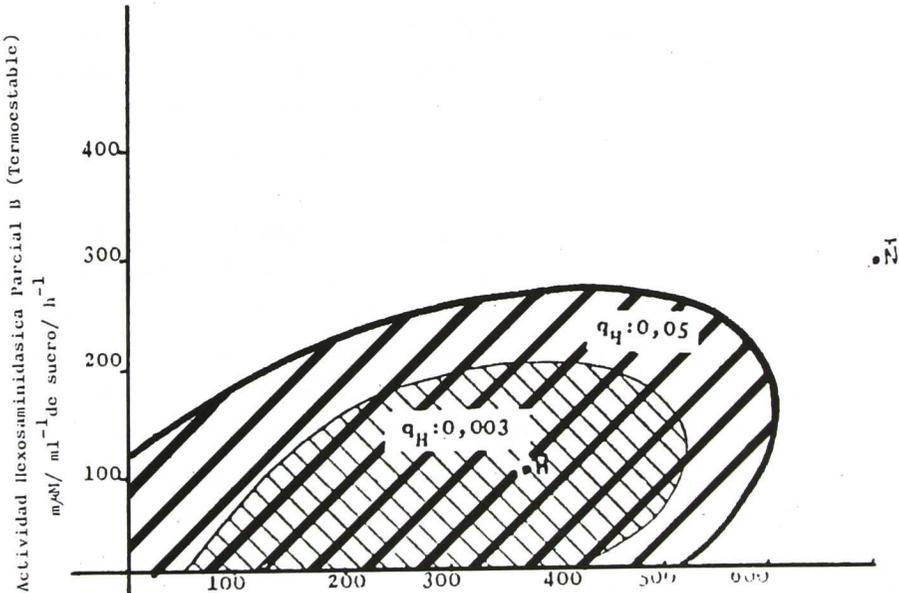


Fig. 2.23. Las elipses permiten efectuar el proceso de discriminación genotípica en forma gráfica en base a los valores de la HEXtotal (eje X) y HEXparcial (eje Y) de cada sujeto. Los puntos que caen dentro de la elipse correspondientes a la proporción $q_H: 0,05$ /// son asignados para los heterocigotos de la región en estudio y los de la proporción $q_H: 0,003$ XXX para aquellos individuos heterocigotos no pertenecientes a la población comprometida. N: media del grupo homocigotos normales. X: media del subgrupo heterocigotos testigos.

proximidad biológica con amerindios, ciertas marcas de origen negro-africano y la presencia del haplotipo A26-B38-Bw4 como representativo centro-europeo o, más específicamente, judío askenasi. Si a estos datos se añaden otras referencias antropológicas, socio-culturales (1, 98) y observaciones propias, es posible distinguir los siguientes rasgos de esta población netamente criolla:

a) supuestamente originada de los primitivos habitantes de la región, los indios Comechingones, hasta la llegada de los españoles en el siglo XVI;

b) grupos familiares semi-aislados por razones geográficas y no de estilo de sectas religiosas estrictamente endogámicas como el "Old Amish Order" (70);

c) indudable aumento de las tasas de endocruzamiento (28);

d) estándar de vida inferior y cuidados de salud relativamente bajos; familias con numerosos hijos en las generaciones precedentes, muertes y adopciones no registradas, y

e) marcada tendencia actual a la desintegración del grupo por corrientes emigratorias de la población, facilitadas por las mejores comunicaciones y búsqueda de nuevas fuentes de trabajo. No obstante, estos caracteres mencionados sólo permiten una parcial interpretación de la presente situación de la ES en la región, ya que aún permanece desconocido el mecanismo operativo original; otras investigaciones en genética poblacional son necesarias para el avance en aspectos no explorados o especulativos del tema. La definición genotípica de heterocigotos de la ES fue incluida por varios autores en sus descripciones casuísticas (18, 38, 84, 108) y en estudios particulares del estado de portador por Kolodny (42), Suzuki (104) y Lowden (61). De estos trabajos quedó establecido que el heterocigoto presentaba descenso de la actividad de la HEXtotal y descenso de la HEXB (fracción termo-estable) en suero sanguíneo.

Sin embargo, en la práctica resultaba dificultosa la estricta aplicación de los valores de referencia debido a su importante variación; así, por ejemplo, para Kolodny la HEXtotal ($\mu\text{M/ml/h}$) y la HEXB (%) presentaron un rango de 333-545 y 18,7% -31,5% (32%-36% zona gris) respectivamente, mientras que Suzuki refirió 358 ± 22 para HEXtotal y 15,5 para el % de HEXB. A esta diferencia se sumaron nuestros resultados previos (77) con valores de 225-680 ($\mu\text{M/ml/h}$) para la HEXtotal y del 18%-64% de la HEXB; esta disparidad observada debía interpretarse al menos en forma preliminar, teniendo en cuenta un importante factor diferencial entre los referidos grupos de estudio: el número disponible de heterocigotos "seguros". En razón a lo expuesto, se procuró establecer bajo cuidadoso control técnico, un patrón originariamente autóctono, propósito favorecido por la oportunidad de contar con 15 heterocigotos obligados y otros 17 heterocigotos parientes de enfermos con diagnóstico preciso de ES, cifras que fueron marcadamente superiores a la y de la literatura y, por ende, mayor seguridad referencial (Tabla 2.6)

En la descripción estadística general (Tabla 2.7) es de notar la “zona gris”, superposición entre valores de los dos subgrupos referenciales, Heterocigotos Testigos y Homocigotos Normales, tanto para la HEXtotal como para el % de la HEXB; para estas situaciones de difícil discriminación individual, adoptamos el criterio seguido por Kolodny: frente a valores aislados dudosos de la HEXtotal o de la HEXB, la confrontación entre los dos resultados del sujeto permitió resolver la asignación del genotipo; igual discernimiento fue aplicado a los sujetos del Grupo Problema en condiciones similares. Para llevar a cabo esta elaboración, que por otra parte excluye las consideraciones debidas a los recientes hallazgos de formas lábiles de la HEXB (75), fue preciso el empleo del PF por su sensibilidad para la medición de la HEXtotal y de las fracciones HEXA y/o HEXB; en cuanto al PC, fácilmente accesible en el medio, si bien permite el diagnóstico preciso de los homocigotos enfermos de ES, en el caso de selección de heterocigotos posibilita una simple y rápida orientación, necesaria de verificación con el PF.

El resultado de la estimación de la frecuencia de portadores de ES de 1 por cada 16 a 29 individuos de la región, señala una heterocigosis excepcionalmente alta, comparable entre las patologías recesivas a la Tirosinemia en la región canadiense de Chicoutimi (49) y a la Enfermedad de Tay-Sachs (ETS) o Gangliosidosis GM₂ Variante B entre los judíos askenasi (39). Esta última entidad, la más común de las esfingolipidosis, ha constituido como proceso neurodegenerativo por atesoramiento lisosomal, un paradigma cuasi perfecto de estudio de la ES, en razón a la gran similitud en varios aspectos (genéticos, clínicos y evolutivos entre otros) y también en la faceta preventiva, a la cual conciernen los siguientes caracteres compartidos: predominio en un grupo étnico o población definida, deficiencia génica en una o en las dos principales isoenzimas de la β -N-acetil hexosaminidasa, idéntico procedimiento de detección de heterocigotos y diagnóstico preciso prenatal (tópico aun no legislado en la Argentina). La analogía entre ambas enfermedades insta, a nuestro entender, a una tarea prospectiva trascendente: procurar el desarrollo adaptativo, es decir la particular regularización en los aspectos médico, social y ético de la ES, al ampliamente experimentado programa preventivo de la ETS (39).

En 1974, Gold y col. introdujeron, por primera vez en genética médica, un método estadístico de detección de alelos mutados en base a una FDC derivada de la aplicación del teorema de Bayes a las funciones de densidad de probabilidad. Para aquellas patologías donde el ensayo enzimático directo es reconocidamente eficaz en la selección de heterocigotos, se utilizó a título de ejemplo, la ETS. En principio, la estimación de una *probabilidad individual a posteriori* de genotipo normal o mutado estuvo sustentada en la posibilidad individual *a priori* de ser o no heterocigoto y en los valores de las actividades de la HEXA y HEXB que, en forma inherente, se correlacionan en una fórmula

estructurada que incorpora los valores de las medias, los desvíos estándares y los coeficientes de correlación de los ensayos bioquímicos (HEXA y HEXB) de un grupo referencial de normales y heterocigotos testigos. Nuevamente el paralelismo fue establecido: el procedimiento resultaba apto para la selección de portadores de la ES.

En nuestros dos subgrupos referenciales, Heterocigotos Testigos y Homocigotos Normales, se demostró que tenían las medias de los valores de la HEXtotal y HEXB desiguales, como asimismo sus matrices de covarianzas. Las diferencias estadísticamente significativas entre las medias y también de las matrices de covarianzas fueron requisitos para el uso de la FDC. Los resultados clasificatorios de aplicar la FDC al Grupo Referencial dieron una evidencia empírica de la aptitud discriminativa del método: una sensibilidad del 100% y especificidad del 98,67%; el error, falso positivo, es considerado como costo de asesoramiento, más tolerable que un falso negativo. Para el caso de los 71 heterocigotos seleccionados del Grupo Problema, la aplicación de la FDC demostró una sensibilidad del 91,18% ya que en la práctica sería mayor al 98% ya que el sujeto de “inconclusa clasificación” por su valor muy cercano a 0, debe retestificarse aplicando el ensayo enzimático a los leucocitos en lugar de suero sanguíneo, método que confiere una confianza mayor al 99% (39).

Conclusiones

1. Ante la preliminar demostración que la ES era altamente frecuente en una circunscripta región argentina, cabía esperar como hipótesis genética, una elevada heterocigosis entre sus pobladores; *la presunción fue confirmada con la estimación de la incidencia del gen anormal de 1 : 16 a 1 : 29.*

2. A partir del guarismo anterior, la propuesta para salud pública es *propender a un programa de prevención de la ES a nivel regional.*

3. *La FDC elaborada provee un método de detección de portadores de ES de alta probabilidad, demostrado por su eficacia discriminante que reveló 100% de sensibilidad y 98,67% de especificidad en el Grupo Referencial. En los 71 heterocigotos seleccionados del Grupo Problema según patrón autóctono, la FDC mantuvo la probabilidad crítica selectiva del método de 0,01 de falsos negativos.*

Resumen

En trabajos preliminares hemos evidenciado una alta frecuencia de la Enfermedad de Sandhoff (ES), deficiencia génica de la actividad hidrolítica de la HEX en sus dos mayores isoenzimas HEXA

y HEXB, en niños criollos de un semi-asilado geográfico de la Argentina. La presente comunicación se refiere a la estimación de la proporción de portadores del gen anormal entre 1.400 escolares de la zona mediante la determinación con sustratos artificiales de la HEXtotal y HEXB Sérica. Los valores de las actividades enzimáticas de 32 heterocigotos testigos, 15 de ellos eran obligados (padres), sirvieron de patrón de referencia autóctono para la detección de 71 heterocigotos de la muestra problema (4,93%). Los límites de confianza del 99% determinaron que la proporción de los heterocigotos en la población estaba en el intervalo 0,0346-0,0636 o sea 1 portador por cada 16 a 29 habitantes de la región, resultado similar a la heterocigosis calculada según la ley de Hardy-Weinberg (1:14 a 1:26). El análisis estadístico de las dos variables empleadas (HEXtotal y HEXB) de los subgrupos referenciales homocigotos normales y heterocigotos testigos, permitió la elaboración de una función discriminante cuadrática (FDC) capaz de discernir, con alta probabilidad entre un genotipo mutado y otro normal. Los datos obtenidos indican una heterocigosis de ES excepcionalmente alta en la población de riesgo y coherente con la frecuencia de homocigotos enfermos reconocidos, otorgándose fundamento a un programa preventivo a nivel regional. Entre tanto, la FDC elaborada provee un recurso eficaz y práctico de asesoramiento individual, sobre todo en el ámbito clínico vinculado al problema.

1992 Charlotte A. Brown, Beth Mc Innes, Raquel Dodelson de Kremer. Don J. Mahuran. *Biochimica et Biophysica Acta* 1180 : 91-98 (8).

II.2.10 Caracterización de dos Hex B gen mutaciones en pacientes argentinos con Enfermedad de Sandhoff

La prevención de la Enfermedad de Sandhoff depende de la identificación de los portadores del gen de esta patología autosómica recesiva y a su vez, la identificación de las mutaciones del gen de la HEXB responsables de la Enfermedad de Sandhoff en la Argentina, constituye el pre requisito esencial para el desarrollo de las técnicas de ADN destinadas al reconocimiento de portadores y al diagnóstico prenatal.

Estos ADN-Tests son valiosos análisis que incrementan la especificidad y por ende el valor predictivo en relación a ensayos enzimáticos corrientemente utilizados para la detección de los heterocigotos; como ya fuera demostrado para otras patologías genéticas estas nuevas técnicas

permiten la precisa definición del estado de portador o no, pero sólo para aquellas mutaciones conocidas.

Hasta ahora, un número grande de mutaciones del gen de la HEXA causantes de la Enfermedad de Tay-Sachs, han sido reconocidas (para una revisión, ver Ref. 95); por el contrario sólo unas pocas mutaciones han sido descritas para el gen de la HEXB. Una de ellas, aparentemente común ya que cuenta con el 27% de alelos conocidos de Sandhoff es una delección de los exones 1-5 por recombinación de los flancos de las secuencias Alu (76). Recientemente McInnes, Brown y Mahuran demostraron en un paciente de Sandhoff dos alelos mutados, cada uno con una delección de 1 ó 2 bp (68). Dos otras raras 'splice-site' mutaciones han sido identificadas. Ellas dan origen a diferentes niveles de actividad residual de la HEXA su vez producida por bajos niveles de apropiado 'spliced' β -subunidad-ARNm. Una de ellas, una transición G A en el intrón 12 (3-6% de actividad residual) estuvo asociada a una forma juvenil de Enfermedad de Sandhoff, mientras que la otra corresponde a una 18-bp duplicación en la unión intrón 13/exón 14 (9-10% de actividad residual) resultando en un estado clínico asintomático (74, 20, 72). También de muy reciente data, ha sido descrito en un paciente japonés con una forma juvenil de Enfermedad de Sandhoff, un estado de homocigoto para una transición C T localizada a 8 nucleótidos después de la unión intrón 10/exón 11; el efecto observado de esta mutación fue el de inhibir el apropiado β -ARNm 'splicing'. Una pequeña cantidad de normal β -ARNm 'splicing' produjo una actividad residual de HEXA del 8% (110). También McInnes, Potier y col. describieron (69) un paciente de 57 años de edad, inusualmente asociado a la Enfermedad de Sandhoff, con una forma compuesta de dos mutaciones, una con la mutación delección 5' (76) y la otra con la C T mutación juvenil intrón 10/exón 11 de la forma juvenil (110).

Para este trabajo se utilizaron líneas celulares de fibroblastos de dos pacientes argentinos no emparentados y de una heterocigota obligada (madre de uno de los niños) bajo la numeración 1954, 2182 y 2187, respectivamente.

Los métodos que fueron empleados para esta investigación representan la batería de las principales técnicas con que cuenta la biología molecular en la actualidad. A título de mención general, se utilizaron aparte de los ensayos enzimáticos, cultivos de fibroblastos a partir de biopsias de piel, aislamiento del ADN genómico de los fibroblastos y de pellas leucocitarias, aislamiento y purificación del ARN-total de fibroblastos, 'Northern blot' análisis, ADN amplificación por PCR (reacción en cadena de polimerasa, 'polymerase chain reaction'), síntesis de cADN y su amplificación, ADN secuenciamiento, ensayos por PCR de las dos mutaciones aquí identificadas (del intrón 2 y del exón 7). Para una detallada descripción de cada uno de los procedimientos ver la Ref. Índice (8). El relato

se circunscribirá a Resultados y Resumen.

Resultados

Previamente ya habían sido utilizadas las líneas celulares 1954 y 2182 por O'Dowd y col. quienes demostraron la no existencia de mayores deleciones o rearrreglos en el gen de la HEXB por medio del 'Southern' análisis (82). 'Northern blot' análisis fue usado para establecer el efecto de la mutación (1) sobre el ARNm de la β -subunidad producido por dichas líneas celulares. En forma adicional, la línea celular de la heterocigota obligada, 2187 (madre de 2182) fue también examinada. Como puede observarse en la Fig. 2.24 el ARNm de la β -subunidad de normal tamaño, 2.2 kb, la cantidad fue claramente detectable tanto en los fibroblastos normales como en la línea celular 2187 de la portadora; en cambio resultaron indetectables los niveles del ARNm en las dos líneas celulares de los dos homocigotos enfermos. Debido a la aparente inestabilidad de ARNm en las dos líneas celulares, se partió de la hipótesis que un defecto sutil podría ser encontrado en un 'splicing aberrante' o en un exón, produciendo un codon de finalización prematuro.

Una mutación puntual fue identificada comparando la secuencia de los nucleótodos de toda la secuencia codificada y de todas las uniones intrón/exón del gen de la HEXB de los fibroblastos de tres pacientes de Sandhoff con los de un control normal. La secuencia del gen de la HEXB en los dos pacientes argentinos (líneas 1954 y 1982) y de la heterocigota obligada (línea 1987) tuvieron una sustitución G A en el primer nucleótido del intrón 2 (Fig. 2.25). El paciente 1954 resultó homocigoto para esta mutación, mientras que el 2182 y 2187 resultaron heterocigotos para esta mutación.

Para determinar si existía una pequeña cantidad de ARNm de la β -subunidad en la línea 1954 (no detectable por 'Northern blot') el ARNm fue aislado, seguido de transcripción invertida y los exones 2-9 amplificados por PCR. Mientras que la longitud esperada de cADN era de 825 bp, con la línea 1954 se produjo una variedad heterogénea de fragmentos de ADN. Tal como cabía de esperar por la severa forma infantil del paciente, la mutación tipo 'splice'-unión que padeció el niño excluía la formación de cualquier cantidad de ARNm normal de la β -subunidad y que resultaba en ausencia de toda actividad residual de la HexA o HexB.

La heterocigosis del ADN de la línea celular 2182 indicaba que más de un alelo mutado de la HEXB afectaba a la pequeña población argentina. Análisis secuencial del ADN genómico del paciente

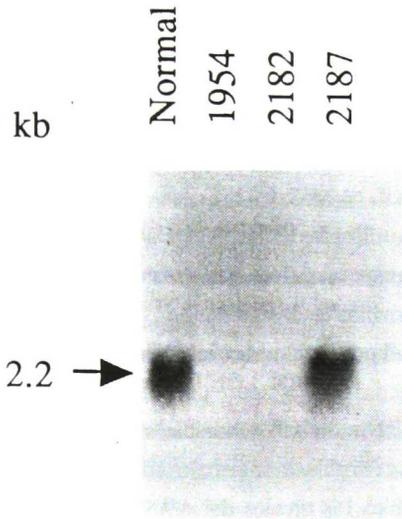


Fig. 2.24. 'Northern blot' análisis de mRNA de la β -subunidad de fibroblastos de un sujeto normal y de pacientes con Enfermedad de Sandhoff. 20 μ g de ARN total de los fibroblastos normales, y de las líneas 1954, 2182 (enfermos) y 2187 (heterocigota obligada, madre del 2182) fueron analizados. El 'blot' fue hidrolizado con una sonda, exón 2 a 9, de la hexosaminidasa β -CADN.

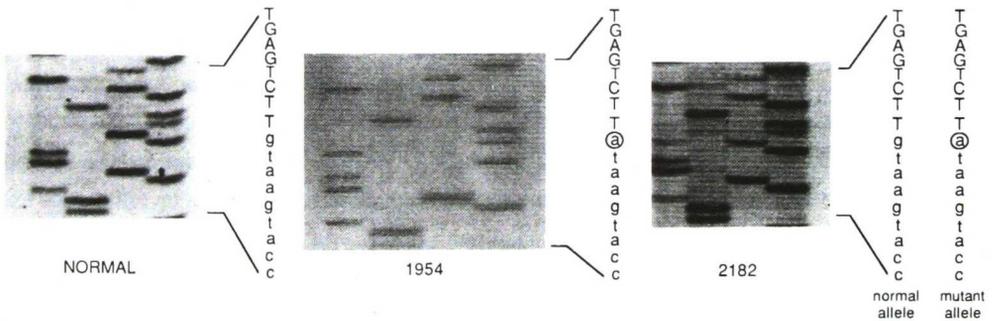


Fig. 2.25. Secuenciamiento de nucleótidos de ADN genómico normal y de dos pacientes argentinos con Enfermedad de Sandhoff a nivel de la unión exón 2/ intrón 1. La mutación, G A (círculo) está localizada en el primer nucleótido del intrón 2. La secuencia de los nucleótidos está consignado al lado de los autoradiogramas. Las zonas de secuenciación en cada panel son de izquierda a derecha A, C, G y T.

2182 reveló una 4-bp deleción (5'-CTTT-3', nucleótidos 784-787) en el exón 7 del segundo alelo (Fig. 2.26). Esta mutación causa un cambio en el marco de lectura debido al stop codon generado por deleción de 35 bp.

Posteriormente, se desarrollaron en el laboratorio de Canadá dos procedimientos no radioactivos destinados a la detección ('screening') de las dos mutaciones identificadas.

La G A sustitución en el intron 2 no crea ni anula un sitio de restricción. Por ello, se diseñó un oligosacárido 'primer' con un único diferente bp para crear un sitio Mae III en el producto del PCR de los alelos normales.

Después de la digestión del Mae III, el alelo normal produce un fragmento de 212-bp; en cambio el alelo mutado por la transición G A el sitio adicional Mal III no se forma, originándose un fragmento mayor de 243-bp. De este modo fue confirmado el estado de homocigota para esta mutación de la línea 1954, mientras que las líneas 2182 y 2187, se confirmaron de ser heterocigotos (Fig. 2.27).

Con el análisis de la colección de nueve otras líneas de Sandhoff infantiles y juveniles con que contaba el Instituto de Investigaciones de Toronto (82), no se encontró para ninguna de ellas, alelos que tuvieran la mutación G A, demostrándose que esta mutación se concentra en la población argentina. Además, otro alelo mutado fue detectado con la digestión por el Mae III en un paciente con Enfermedad de Sandhoff de origen europeo (línea 2012) resultando heterocigoto para una G C transición en vez del G A, siempre refiriéndonos a mutaciones en el intrón 2 (Fig. 2.28)(también en Fig. 2.27).

Con el objetivo de desarrollar un procedimiento también simple para la detección de portadores de la 4-bp deleción en el exón 7, se estudió la anormal migración de heteroduplex formados entre dos fragmentos homólogos de PCR, uno de los cuales contenía una pequeña inserción o deleción (106). El ADN de la colección de líneas de pacientes con Enfermedad de Sandhoff fueron aislados, y los fragmentos de la región del exón 7 conteniendo la deleción de las 4-bp deleción fueron amplificados por PCR y analizados sobre un gel de poliacrilamida al 8%. El ADN control contenía una banda de 280-bp, tamaño esperado del producto amplificado. El ADN de la línea 2182 también tenía dicha banda y presumiblemente otra banda indistinguible a 276-bp debido a la deleción de 4-bp. Sin embargo, la presencia de la pequeña deleción en una de las hebras de un heteroduplex fue detectable por la presencia de dos bandas de mayor peso molecular en el ADN del paciente (Fig. 2.28). Además, la deleción 4-bp en el exon 7 destruye un sitio de restricción del MmnI. Por ello la digestión de ADN normal y

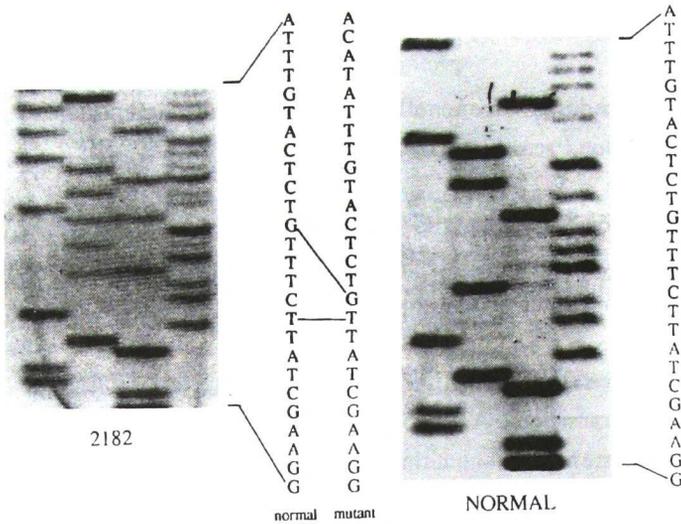


Fig. 2.26. Secuenciamiento de nucleótidos de ADN genómico normal y mutado en la región del exón 7 conteniendo la deleción 4-bp. El segmento del gen normal y mutado conteniendo el exón 7 fue amplificado y secuenciado directamente. El panel de la derecha corresponde a la secuencia de un área del exón 7 de la β -subunidad perteneciente a un sujeto normal. El panel de la izquierda pertenece al paciente 1982 con la deleción de 4 bd de 5'-CTTT-3' (exón 7, nucleótidos 11 - 14) que estuvo presente en uno de los dos alelos. La localización de la deleción está indicada por las barras negras entre las secuencias del alelo normal y el mutado. La secuencia de los nucleótidos determinados del ADN normal y de los alelos normal y mutado del paciente 2182 están en lista al lado de los autoradiogramas. Las zonas de secuenciamiento en cada panel son de izquierda a derecha A, C, G y T.

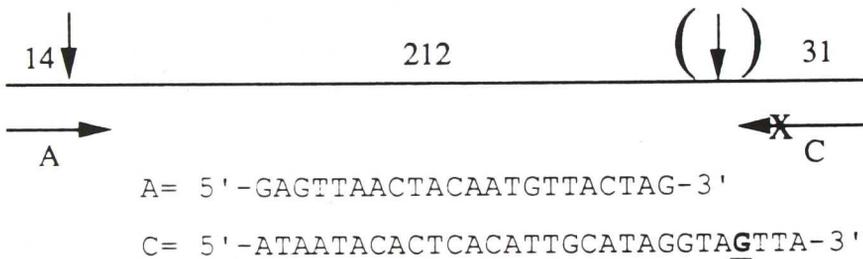


Fig. 2.27. Representación esquemática de la secuencia amplificada del sitio de 'splicing' de la mutación del intrón 2. Los oligosacáridos 'primers' utilizados para la amplificación del ADN son mostrados con flechas horizontales señalados como A y C con la respectiva secuencia de nucleótidos (El nucleótido combinado en C está subrayado). La X representa la localización del nucleótido cambiado en el oligonucleótido C el cual crea un sitio adicional del Mae III en el ADN amplificado normal. Las posiciones de los sitios de acción del Mae III están indicadas por las flechas verticales siendo el nuevo sitio creado el encerrado entre paréntesis. Los números por arriba de la barra horizontal son los tamaños (bp) de los fragmentos generados por clivaje del Mae III.

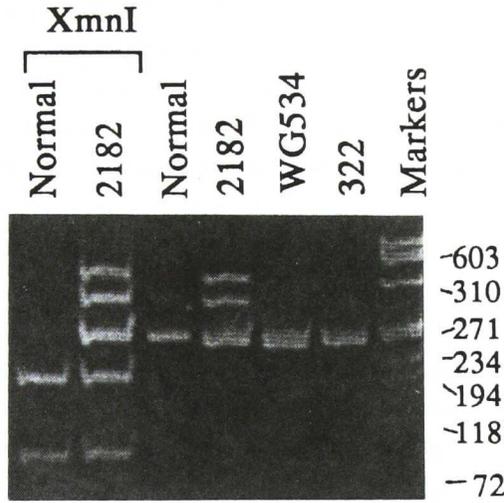


Fig. 2.28. Electroforesis en gel de agarosa de ADN amplificado en el sitio circundante de la mutación en el intrón 2. ADN genómico (0.5 µg) amplificado en la región de la unión exón 2/ intrón 2. Los productos amplificados fueron digeridos con Mae III y sujetos a electroforesis sobre un gel de agarosa. Las líneas celulares están identificadas con números en la parte superior de cada banda de migración. La línea celular 1954 es homocigota para la G A mutación, en cambio las líneas 2182 y 2187, de un paciente con Sandhoff de origen europeo, se presenta heterocigota para la mutación del exón 2/ intrón 2 por el análisis de la Mae III digestión. El secuenciamiento reveló una G C mutación en el sitio de 'donor-splice'. 2010 es un ejemplo típico de una línea celular sin la mutación en el intrón 2. La banda superior visible en la mayoría de las muestras representa el ADN no digerido.

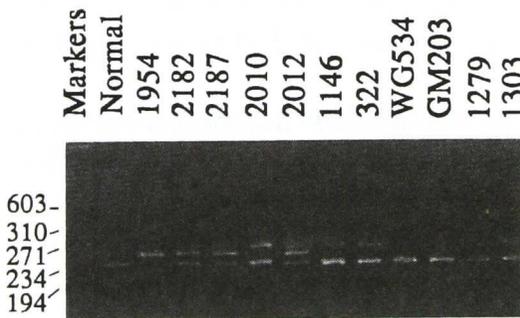


Fig. 2.29. Electroforesis en gel de poliacrilamida de ADN genómico (0.5µg) amplificado en la región de la delección de 4-bp en el exón 7, previa y posteriormente a la digestión con X nm I, según se encuentra indicado, la línea celular 2182 demostró ser heterocigota para la mutación de 4-bp delección, tanto con el 'pattern' digerido con X nm I como por la formación de dos bandas diagnósticas superiores del heteroduplex en el ADN no digerido. El ADN normal y las líneas de Sandhoff WG 534 y 322 (no argentinas) son ejemplares de líneas celulares no afectadas de esta mutación en el exón 7 con delección 4-bp.

amplificado por esta enzima produce dos bandas de 90 y 190 bp (Fig 2.28). El fragmento de ADN amplificado de la línea 2182, el cual es heterocigoto para esta mutación, también dió estas dos bandas (producto de la digestión del alelo normal), pero en adición produjo una banda de 276-bp, representando el alelo mutado sin el sitio de restricción. La presencia de un alelo mutado no digerido por la XmnI, permitió además la retención de las bandas diagnósticas del heteroduplex. (Fig. 2.28).

Resumen

En este trabajo se analizaron los ADN genómicos de dos de los pacientes con la Enfermedad de Sandhoff procedentes de Córdoba, Argentina. Uno de ellos resultó homocigoto para una G A sustitución en el intrón 2. Esta mutación anula completamente la formación de ARNm de la β -subunidad de la HEXB. El segundo paciente presentó una mutación doble, una correspondió a la G A sustitución del intrón 2 y el segundo alelo se debió a una delección de 4-bp en el exon 7. El ARNm de la β -subunidad de este alelo fue inestable, presumiblemente debido a un codón de finalización prematuro introducido por la mutación. Dos nuevos ensayos por PCR fueron desarrollados para la detección de estas mutaciones. Por otro lado, estos resultados han provisto ejemplo de como la heterogeneidad genética puede existir aún en pequeñas poblaciones geográficamente aisladas.

Trabajo presentado parcialmente al XIX Congress of the Mexican Biochemical Society, Ixtapa, México, Septiembre 27, October 2, 1992. "Sandhoff Disease in Argentina: Enzymatic and Genetic Studies". F.Kleiman, R. Gravel, A. Oller, R.D. de Kremer, C.E.Argaña.

2.2.11 Aplicación de las técnicas de PCR para la caracterización de las mutaciones ya identificadas de la Enfermedad de Sandhoff en la población de alto riesgo del Valle de Traslasierra de Córdoba.

Como parte de un acuerdo de trabajo cooperativo con el Dr. Roy Gravel del Mc Gill University (Montreal, Canadá), una integrante de nuestro grupo, la Bioquímica Frida Kleiman (Becaria del Consejo de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Provincia de Córdoba, CONICOR), realizó un entrenamiento y tarea experimental en el laboratorio del Dr. Gravel, en la primera mitad de 1992, continuándolos en el presente en Córdoba, R.A.

El material que obtuvimos para este trabajo fueron 100 muestras de sangre de individuos de la región distribuidos en la siguiente forma: 68 individuos de la población sin antecedentes de Enfermedad de Sandhoff, 36 sujetos pertenecientes a familias con antecedentes de al menos un niño con diagnóstico preciso de Enfermedad de Sandhoff y también el material de dos nuevos enfermos previamente no estudiados desde el punto de vista de genética molecular. El material fue separado en plasma sanguíneo y pella leucocitaria efectuándose la extracción del ADN genómico de este último material. Las técnicas de PCR que se aplicaron en este estudio, fueron las del trabajo anterior (8).

En la **Tabla 2.8** se presentan los resultados hasta aquí obtenidos que señalan con toda claridad que la sustitución G A del intrón 2 es la forma de mutación predominante y hasta ahora únicamente descrita en la población argentina; la otra mutación, la delección en el exón 7, no fue esta vez hallada ni en los enfermos ni en los portadores argentinos. Con respecto a estos últimos corresponde señalar dos importantes hallazgos: primero, se observó una óptima correlación de la identificación de los heterocigotos ‘seguros’ (pertenecientes a familias involucrados) del método enzimático, que hemos estandarizado con los de las técnicas ADN y segundo, se estableció una posible tercera mutación en 3' del exón 14. Esta probable, distinta mutación, fue encontrada en un heterocigoto obligado (con el otro alelo mutado en el intrón 2), en su hijo heterocigoto aparentemente sano (asimismo con el otro alelo mutado en el intrón 2) y en una mujer de la población general con actividad enzimática correspondiente a valores de heterocigota. F. Kleiman continúa avanzando en su trabajo para el doctorado bajo la dirección del Prof. en Genética Molecular Carlos Argarana, (Dpto. de Química Biológica - CIQUIBIC, Facultad de Ciencias Químicas, U.N.C.), con miras a la identificación de esta presunta mutante, su eventual significación funcional e implicancias en la expresión clínica.

II.2.12 Caracterización de la β -Subunidad de la HEX en heterocigotos de la Enfermedad de Sandhoff.

Esta línea ampliatoria del tema central se está llevando a cabo en CEMECO por la Bióloga Ana María Oller de Ramirez, Becaria del CONICOR, proyecto que bajo mi dirección, esta dirigido a cumplimentar su Doctorado en Ciencias Biológicas.

El aspecto relevante propuesto para la investigación es estudiar la amplia variación en la actividad enzimática e la HEXB en los heterocigotos de la Enfermedad de Sandhoff tanto en suero sanguíneo como en leucocitos y propender a aclarar al menos dos supuestas relaciones causales: una, referida

Tabla 2.8 Diagnóstico enzimático versus ADN-técnicas

Individuos analizados	Diagnóstico enzimático	Mutaciones estudiadas (número de alelos)			
		16 Kb (exón 1 - 5)	CTTT (exón 7)	Sustitución (intrón 2)	Variación sec 3'
2 enfermos	+	0	0	4	0
36 familiares de 5 pacientes	19 portadores	0	0	19	2
68 individuos de la población general	11 portadores (?)	0	0	0	1

F. KLEIMAN, C.E. ARGARANA, R.D. DE KREMER, A. OLLER y R. GRAVEL. Departamento de bioquímica-CIQUIBIC, Facultad de Ciencias Químicas, CEMECO, Hospital de Niños, Córdoba, Argentina y Childrens Hospital, McGill University, Montreal, Canadá.

a la estructura de la HEXB y/u otras formas isoenzimáticas de la cadena β . polipeptídica y la otra, tratar de colegir la posible relación entre variación de la proteína-enzima y una específica mutación del gen de la HEXB. El punto de partida para esta investigación estuvo en datos registrados en trabajos previos y comentarios in pag.

En forma resumida el plan de trabajo fue programado para la:

1. Separación y cuantificación de las isoenzimas de la HEX por técnicas enzimáticas, cromatografía de enfoque y electroforéticas.
2. Caracterización de las fracciones isoenzimáticas a través de sus parámetros cinéticos (afinidad de sustrato, k_m , $V_{m\acute{a}x}$) y estructurales (termolabilidad, punto isoelectrico, secuenciamento de aminoácidos entre otros).
3. Correlación de los hallazgos de las eventuales alteraciones estructurales de la isoenzima(s) con mutaciones específicas.

Estado de avance: Resultados Preliminares

1. Ampliación del número de controles normales no pertenecientes a la población de riesgo.

a. Determinaciones de la actividad de la HEX en plasma sanguíneo, método fluorogénico.

En **Tabla 2.9** se muestran los valores obtenidos en tres grupos etarios y en la **Tabla 2.10** el resultado del análisis estadístico realizado sobre todos los individuos testificados desde el comienzo del Proyecto de la Becaria Oller.

b. Determinaciones de la actividad de la HEX en pella leucocitaria, método fluorogénico.

En la **Tabla 2.11** se muestran los datos obtenidos por vez primera en leucocitos de dos grupos etarios normales tanto en los valores de la HEXtotal como el de los del fraccionamiento isoenzimático; los parámetros autóctonos constituyen la información indispensable para elucidar situaciones de dudosa asignación genotípica. Para una simplificación de la información estadística de igual manera para el plasma sanguíneo, se aunaron los datos obtenidos en leucocitos de todos los controles sanos en un solo grupo. (**Tabla 2.11**).

2. Ampliación del número de sujetos involucrados con la Enfermedad de Sandhoff. Heterocigotos 'seguros' (obligados y familiares).

a. Determinación de la HEX en plasma sanguíneo de 27 nuevos heterocigotos.

En la **Tabla 2.12** se señala el análisis estadístico de los valores obtenidos y en la **Fig. 2.30** se ilustra gráficamente a los 27 sujetos testificados y su relación con la media normal, tanto respecto a la HEXtotal (A+B) como a la HEXB (B). Allí puede observarse que para ambas expresiones, aunque mayor para la HEXtotal, varios sujetos 'caen' en la "zona gris".

Tabla 2.9: Análisis estadístico de los valores de HEX sérica en controles sanos

	HEX TOTAL		HEX PARCIAL			
			(HEX B)		% HEX B de la HEXtotal	
	X	DS	X	DS	X	DS
Recién nacidos	528.51 n=4	62.06	267.05 n=4	51.15	50.42 n=4	6.77
Niños	676.18 n=36	232.87	284.45 n=32	137.52	40.46 n=32	6.97
Adultos	593.48 n=38	173.23	240.88 n=38	110.72	39.51 n=38	6.86

TABLA 2.10: HEX en Suero en Controles Normales

HEX TOTAL n=78 nm/ml.s/hora		HEX PARCIAL			
		(HEX B) n=74 nm/ml.s/hora		% HEX B n=74	
X	DS	X	DS	X	DS
628.32	204.95	261.14	122.73	40.51	7.31

Tabla 2.11: Análisis estadístico de la HEX en leucocitos en controles sanos						
	HEX TOTAL		HEX PARCIAL			
			(HEX B)		% HEX B de la HEXtotal	
	X	DS	X	DS	X	DS
Niños n=7	942.13	263.18	334.30	79.53	36.31	5.31
Adultos n=10	1112.44	538.39	433.73	207.84	39.37	6.36

TABLA 2.12: HEX en Leucocitos en Controles Normales					
HEX TOTAL n=17 nm/ml.s/hora		HEX PARCIAL			
		(HEX B) n=17 nm/ml.s/hora		% HEX B n=17	
X	DS	X	DS	X	DS
1042.31	453.93	392.78	174.38	38.11	6.14

HEX. EN SUERO HETEROCIGOTAS

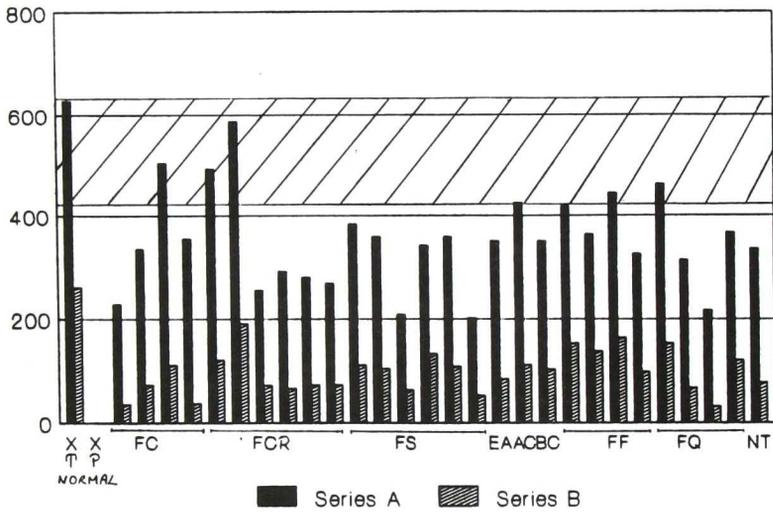


Fig. 2.30. Expresión gráfica de los valores de la HEXtotal y de HEXB obtenidos en el suero sanguíneo de 27 portadores de la Enfermedad de Sandhoff. Obsérvese que tanto para la HEXtotal como para la HEXB varios de los individuos testificados "caen" en la media o muy cerca de la media de los individuos normales (zona gris).

b. Determinaciones de la HEX en leucocitos del grupo de 27 nuevos heterocigotos.

En la **Tabla 2.13** aparecen los datos de las medias y desviaciones estándares de los valores de la HEXtotal y HEXB de los 27 portadores y en la **Fig 2.31** se presenta el histograma correspondiente. (El individuo N.T., último en la representación gráfica, resultó no ser el padre de un niño muerto por Enfermedad de Sandhoff).

Este estudio en leucocitos resultó ampliamente satisfactorio ya que la dispersión de los valores individuales, en los portadores, quedó resuelta en forma totalmente definitiva en los 27 sujetos testigos estudiados. En consecuencia, la asignación genotípica mediante la determinación de la HEXB en la pella leucocitaria es un recurso de extraordinario valor práctico para aquellas situaciones de duda con el ensayo enzimático en plasma sanguíneo.

3. El efecto de la termo-inactivación de la HEXtotal y de la HEXB en controles normales y en heterocigotas son mostrados en las **Figs. 2.32 y 2.33**, respectivamente. El comportamiento de 5 controles sanos y de 4 heterocigotas demostró que 3 de los últimos fueron semejantes a los controles aunque presentaron una ligera mayor labilidad y la cuarta heterocigota (JAL) presentó una labilidad mucho mayor tanto para la HEXtotal como para la HEXB.

Ciertos datos de importancia van surgiendo; por ejemplo, la heterocigota JAL presenta hasta ahora, tres hallazgos distintivos:

a. Actividad de la HEXtotal extraordinariamente baja: 210nM/ml plasma/hora. (Otros portadores media: 351,13 y normales, media: 628,32 nM/ml plasma/hora).

b. Porcentaje de HEXB también muy descendida: 10% de la HEXtotal (Otros portadores media: de 27,13% y normales, media: de 40,51%) y

c. Comportamiento frente al calor demostró la mayor labilidad tanto para HEXA como para la HEXB. Su mutación no ha sido aun definida; si se conoce la de su sobrina muerta de Enfermedad de Sandhoff con la mutación en el intrón 2.

4. Cromatografía de intercambio iónico sobre DEAE-Celulosa, según método de Lowden (60).

Obsérvese en la **Fig. 2.34** un perfil isoenzimático total de un sujeto control normal; compárese el cambio del perfil isoenzimático de las fracciones de la HEXB e HEXI cuando la misma muestra sanguínea era de 1 día, 8 meses y 9 1/2 meses de conservación a -20°C (a.b.c' respectivamente); en cambio esos resultados no se reprodujeron al menos por ahora, en dos heterocigotos en sus respectivos plasmas con 11 meses de conservación (**Fig 2.35 a y b**).

TABLA 2.13: HEX en Leucocitos de Heterocigotos Seguros

HEX TOTAL n=27 nm/ml.s/hora		HEX PARCIAL			
		(HEX B) n=27 nm/ml.s/hora		% HEX B n=27	
X	DS	X	DS	X	DS
373.23	134.08	104.42	30.13	29.55	8.02

HEX. EN LEUCOCITOS HETEROCIGOTAS

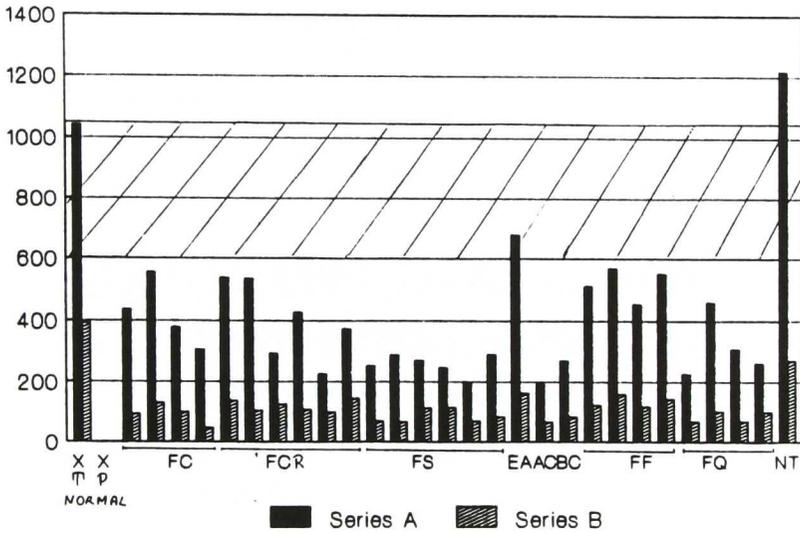


Fig. 2.31 .Expresión gráfica de los valores de la HEXtotal y de la HEXB obtenidos en pella leucocitaria de los 27 iguales individuos portadores que los mostrados en la figura 2.30.

Nótese que con este material la definición genotípica es óptima en particular con la determinación de la HEXB que da un 100% (para estos 27 casos) de sensibilidad. (El individuo señalado como N.T. resultó no ser el padre del niño fallecido por Enfermedad de Sandhoff).

TERMO - INACTIVACION DE LA HEXOSAMINIDASA TOTAL CONTROLES Y HETEROCIGOTAS

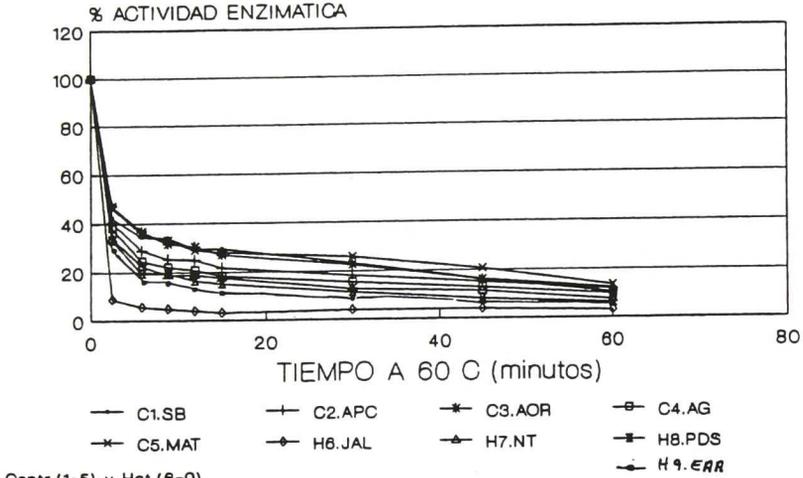


Fig. 2.32 Termo-inactivación de la HEXtotal en controles y Heterocigotos

TERMO-INACTIVACION DE LA HEXOSAMINIDASA B CONTROLES Y HETEROCIGOTAS

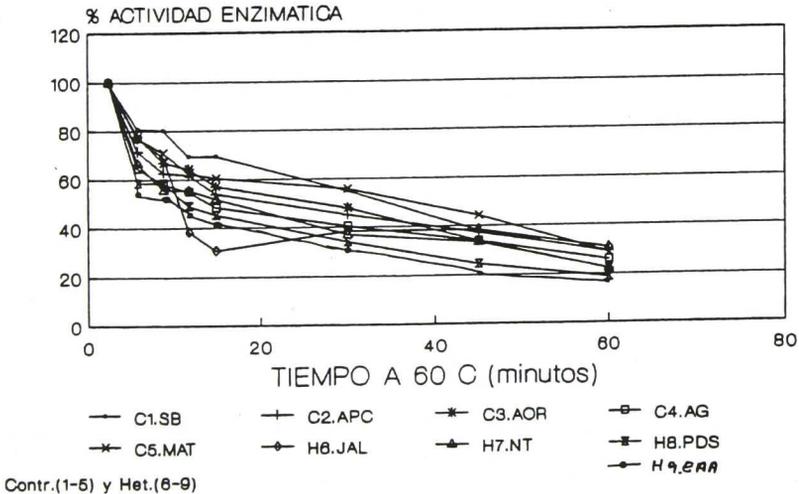
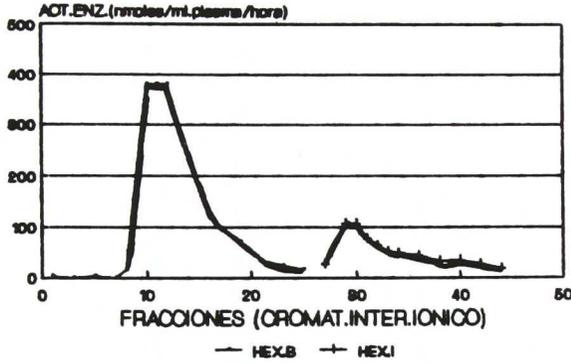
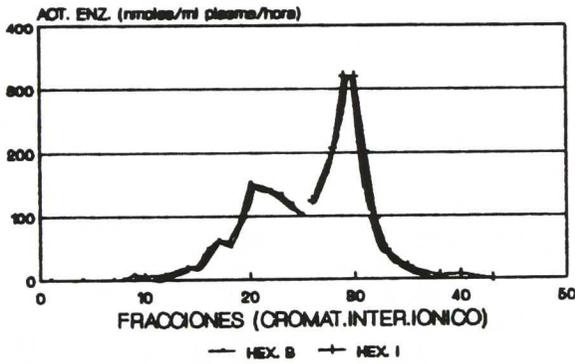


Fig. 2.33. Termo-inactivación de la HEXB en controles y heterocigotos.

PLASMA 1 DIA HEX. B e I



PLASMA 8 MESES HEX. B e I



PLASMA 9 1/2 MESES HEX. B e I

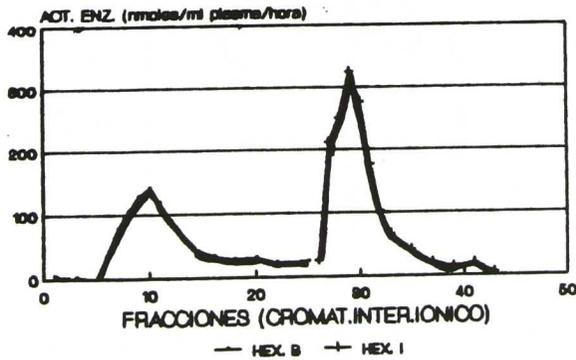
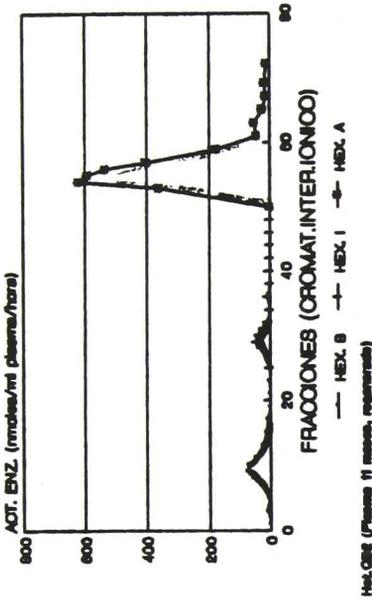
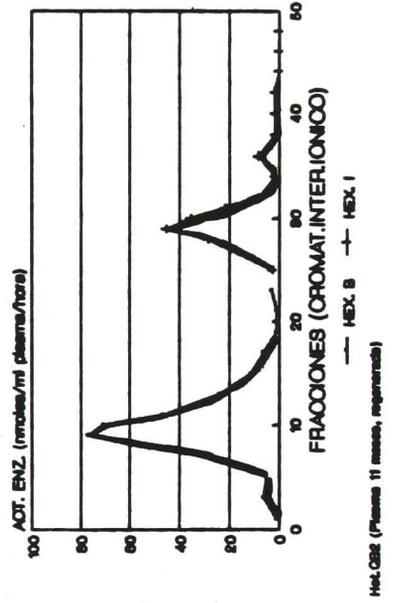


Fig. 2.34. Perfil isoenzimático de un individuo control normal del plasma de 1 día, 8 meses y 9 1/2 meses de conservación a -20°C.

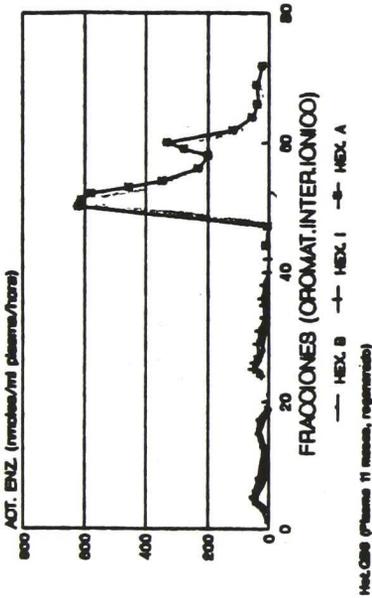
**b. PERFIL ISOENZIMÁTICO TOTAL
HEX. B, I y A**



**PLASMA 11 MESES
HEX. B e I**



**a. PERFIL ISOENZIMÁTICO TOTAL
HEX. B, I y A**



**PLASMA 11 MESES
HEX. B e I**

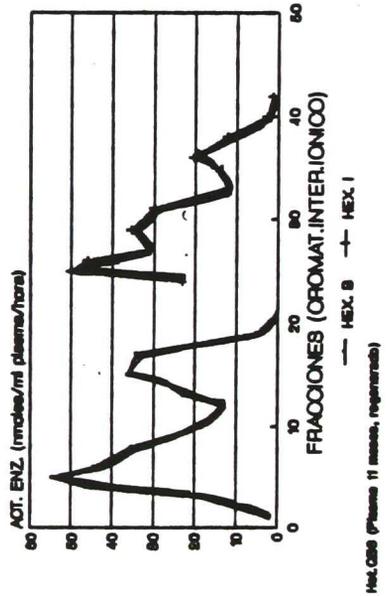


Fig. 2.35. Perfil isoenzimático de dos heterocigotos, a y b, de plasma de 11 meses de conservación a -20°C. Compárese con la figura 2.34; no se observa convertibilidad de la HEXB a la HEXI.

Comentario

El hallazgo arriba señalado y que obviamente necesita verificación con una serie de otros experimentos similares, tanto en controles sanos como en heterocigotos, muestra en forma preliminar una clara evidencia de interconvertibilidad de la HEXB a HEXI a partir de un período de conservación a -20°C (comprobado desde los 8 meses de conservación). Este fenómeno no fue observado en los perfiles isoenzimáticos de dos heterocigotos compuestos.

Actualmente la hipótesis de trabajo está en torno a las siguientes incógnitas:

- ¿ La HEXI, forma isoenzimática menor, podrá tener alguna implicancia en la variación de la actividad enzimática observada entre los heterocigotos ?.
- ¿Cuál es la significación funcional y cuáles los mecanismos que regulan la HEXI ?.
- ¿Cuál es la diferencia estructural en la HEX I y la HEXB ?.
- ¿ Por qué razón los heterocigotos no interconvierten de HEX B a HEX I ?.

Tercera Parte

Resumen, Referencias, Agradecimientos,
Índice Analítico

RESUMEN

Desde aproximadamente 1970, emprendí la búsqueda sistemática de los denominados Errores Congénitos del Metabolismo o Enfermedades Metabólicas Hereditarias (EMH), área de la Genética Médica que trata básicamente, de las alteraciones o defectos a nivel génico.

Esta línea de investigación, inédita en el medio, tuvo desde sus comienzos tres objetivos centrales: a) Conocer si las EMH existían entre nosotros y lograr la formación teórico-práctica para su eventual reconocimiento, b) Descubrir las entidades predominantes o las variantes autóctonas y c) Progresar fundamentalmente en el conocimiento y en el manejo racional del genérico Retardo Mental.

Un amplio y variado espectro de EMH fueron emergiendo, lentamente, entre los diagnósticos precisos del Centro de Estudio de las Metabolopatías Congénitas: Aminoacidopatías (Fenilcetonuria, Homocistinuria, Hiperglucemia no Cetósica, Deficiencia en Orintina carbamiltransferasa, Tirosinemia, Enfermedad de Jarabe de Arce) o Cetoacidosis de cadena ramificada; Alteraciones en Hidratos de Carbono (Glucogenosis Tipo 0, Tipo Ia, Tipo III, Tipo IX, Intolerancia Hereditaria a la Fructosa, Galactosemia); Orgánico Acidurias Genéticas (Acidemia Isovalérica, Deficiencia en B-Cetotiolasa Mitocondrial, Deficiencia en 3-Hidroxi-3-Metilglutaril CoA Liasa); Defectos en la Cetoutilización (Deficiencias en la Succinil CoA-Acetoacetato CoA-transferasa); Patologías de Atesoramiento Lisosomal (Enfermedad de Gaucher, Enfermedad de Fabry o Deficiencia en Alfa-Galactosidasa, Enfermedad de Sandhoff); Alteraciones de Glicoproteínas (Enfermedad de Salla, Mucopolipidosis II o I-Cell Disease, Mucopolipidosis III); Mucopolisacaridosis (Hurler, Hunter, San Filippo, Morquio IVa; Maroteaux-Lamy, Enfermedad de Sly o Deficiencia en β -Glucuronidasa); Alteraciones en los Sistemas de Transporte (Cistinuria, Enfermedad de Hartnup, Cistinosis) y Porfirias (Aguda Intermitente y Variegata); Misceláneas: Enfermedad de Menkes o Deficiencia del Cobre, Lipofuscinosis Neuronal Ceroidea y Enfermedad de Duchenne; entre otros.

Del contexto anterior surgió como interés prevalente por su importancia numérica, la Enfermedad de Sandhoff. Los estudios sobre esta entidad han transitado todos los niveles de creciente complejidad exigibles, no solo para el cotejo con experiencias foráneas sino como pruebas de constante capacitación en los conocimientos teóricos y metodológicos (propios o colaborativos): observaciones clínicas, precisión nosológica, circunscripción de un lugar geográfico y caracterización de su etnia, estimación de la frecuencia de portadores en la región de riesgo y estudios a nivel molecular

del defecto con miras a la precisa definición genotípica para un adecuado asesoramiento genético.

El trabajo aquí presentado, pretende reflejarse como un paradigma de estudio de otros múltiples procesos neurodegenerativos hereditarios y que constituye, eslabón tras eslabón, la etapa previa sin la cual no se podría alcanzar la meta de una terapia racional. Si a ello se agrega la integración de la práctica asistencial con las ciencias médicas básicas, la formación de recursos humanos interdisciplinarios, la conmutatividad entre centros de iguales intereses, la contribución cambia su sesgo individual a otro más amplio de solidaria humanidad.

REFERENCIAS

1. **Barrionuevo Imposti V.** En: Historia del Valle de Traslasierra (Córdoba), Tomo 1. Dirección General de la Universidad Nacional de Córdoba, República Argentina, 1953.
2. **Berent SL, Radin NS:** β -Glucosidase activador protein from bovine spleen ('Coglucosidase'). *Arch Biochem Biophys* 208:248, 1981.
3. **Beutler E, Kuhl W, Comings D:** Hexosaminidase isoenzyme in type 0 GM₂-Gangliosidosis. *Am J Hum Genet* 27:628, 1975.
4. **Birth Defects:** The clinical delineation of birth defects. Part. VI. Nervous System. The National Foundation, March of Dimes, 1971, vol VII, nº 1.
5. **Boedecker HJ, Mellman WJ, Tedesco TA, Croce CM:** Assignment of the human gene for hex β to chromosome 5. *Exp Cell Res* 93:468, 1975.
6. **Braidman I, Carroll M, Dance N, Robinson D, Poenaru L, Weber A, Dreyfus JC, Overdijk B, Hooghwinkel GJM:** Characterization of human N-acetyl- β -hexosaminidase C. *FEBS Lett* 41:181, 1974
7. **Bremer EG, Schlessinger J, Hakomori S:** Ganglioside-mediated modulation of cell growth. Specific effects of GM3 on tyrosine phosphorylation of epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem* 261:2434, 1986.
8. **Brown CA, McInnes B, De Kremer RD, Mahuran DJ:** Characterization of two HEXB gene mutations in Argentinean patients with Sandhoff disease. *Biochim Biophys Acta:* 1180:91, 1992.
9. **Chern CJ, Beutler E, Kuhl W, Gilbert F, Mellman WJ, Croce CM:** Characterization of heteropolymeric hexosaminidase A in human X mouse hybrid cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 73:3637, 1976.
10. **Chern CJ, Kenneth R, Engel E, Mellman WJ, Croce CM:** Assignment of the structural genes for the α -subunit of hexosaminidase A, mannose phosphate isomerase and pyruvate kinase to the region of 22 qter of human chromosome 15. *Somatic Cell Genet* 3:533, 1977.

11. Conchie J, Hay A: Mammalian glycosidases. 4. The intracellular localization of β -galactosidase, α -mannosidase, β -N-acetylglucosaminidase and α -L-fucosidase in mammalian tissues. *Biochem J* 87:354, 1963.
12. Conzelmann E, Burg J, Stephan G, Sandhoff K: Complexing of glycolipids and their transfer between membranes by the activator protein for degradation of lysosomal ganglioside GM₂. *Eur J Biochem* 123:455, 1982.
13. Conzelmann E, Sandhoff K: AB variant of infantile GM₂-gangliosidosis: Deficiency of a factor necessary for stimulation of hexaminidase A-catalyzed degradation of ganglioside GM₂ and glycolipid GA₂. *Proc Natl Acad Sci USA* 75:3979, 1978.
14. Conzelmann E, Sandhoff K: Purification and characterization of an activator protein for the degradation of glycolipids GM₂ and GA₂ by hexosaminidase A. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für Physiologische Chemie* 360:1837, 1979.
15. De Kremer RD, Boldini CD, Capra AP, Hliba E: Enfermedad de Salla (Sialuria, Tipo Finlandes). Nueva variante clínica en un primer reconocimiento argentino. *Medicina* 50:107, 1990.
16. De Kremer R, Boldini CD, Capra AP, Levstein IM, Bainttein N, Hidalgo PK, Hliba E: Sandhoff Disease: 36 cases from Córdoba, Argentina. *J. Inher Metab Dis* 8:46, 1985.
17. De Kremer R, De Levstein I: Enfermedad de Sandhoff o gangliosidosis GM₂ tipo 2. Alta Frecuencia del gen en una población criolla. *Medicina* 40:55, 1980.
18. DerKaloustian VM, Khoury MJ, Hallal R, et al: Sandhoff disease: A prevalent form of infantile GM₂ gangliosidosis in Lebanon. *Am J Hum Genet* 33:85, 1981.
19. Dewji NN, De-Keyser DR, Stirling JL: Purification and characterization of β -N-acetylhexosaminidase I₂ from human liver. *Biochem J* 234:157, 1986.
20. Dlott B, D'Azzo A, Quon DVK, Neufeld EF: Two mutations produce intron insertion in mRNA and elongated β -subunit of human β -hexosaminidase. *J Biol Chem* 265:17921, 1990.
21. Dreyfus JC, Poenaru L, Svennerholm L: Absence of hexosaminidase A and B in a normal adult.

N Engl J Med 292:61, 1975.

22. Dreyfus JC, Poenaru L, Vibert M, Ravise N, Boue J: Characterization of a variant of β -hexosaminidase: "Hexosaminidase Paris". Am J Hum Genet 29:287, 1977.
23. Durand P, O'Brien JS, (Editors). Genetic Errors of Glycoprotein Metabolism. Edi-ermes, Milan and Springer-Verlag, Berlin p.151.
24. Fischer G, Jatzkewitz H: The activador of cerebroside sulphatase. Purification from human liver and identification as a protein. Hoppe- Seyler's Zeitschrift für Physiologische Chemie 356:605, 1975.
25. Frohwein YZ, Gatt S: Separation of β -N-acetylglucosaminidase and β -N-acetylgalactosaminidase from calf brain cytoplasm. Biochim Biophys Acta: 128:216, 1966.
26. Gärtner S, Conzelmann E, Sandhoff K: Activador protein for the degradation of globotriaosylceramide by human α -galactosidase. J Biol Chem 258:12378, 1983.
27. Geiger B, Arnon R, Sandhoff K: Immunochemical and biochemical investigation of hexosaminidase S. Am J Hum Genet 29:508, 1977.
28. Giraud C, Gomez V, Marcellino A: Estudio inmunogenético en un semiaislado humano de la sierra de Comechingones (Córdoba, Argentina). Medicina (Bs Aires) 42 (Supl. 1):51, 1982.
29. Gleeson PA, Schachter H: Control of glycoprotein synthesis. UDP-GlcNAc: Gn Gn (GlcNAc to MAN α 1-3) β 4-N-acetyl-glucosaminyl transferase IV, an enzyme in hen oviduct which adds GlcNAc in β 1-4 linkage to the α 1-3 linked man residue of the trimannosyl core of N-glycosyloligosaccharydes to form a triantennary structure. J Biol Chem 258: 6162, 1983.
30. Gold RJM, Maag UR, Neal JL, Scriver CR: The use of biochemical data in screening for mutant alleles and in genetic counselling. Ann Hum Genet 37:315, 1974.
31. Hakomori S-i: Glycosphingolipids in cellular interaction, differentiation, and oncogenesis. Annu Rev Biochem 50:733, 1981.
32. Hanai N, Nores GA, MacLeod C, Torres-Mendez CR, Hakomori S-i: Ganglioside-mediated

modulation of cell growth. Specific effects of GM₃ and lyso-GM₃ in tyrosine phosphorylation of the epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem* 263:10595, 1988.

33. Hansson HA, Holmgren J, Svennerholm L: Ultrastructural localization of cell membrane GM₁ ganglioside by cholera toxin. *Proc Natl Acad Sci USA* 74:3782, 1977.

34. Hultberg B: N-Acetylhexosaminidase activities in Tay-Sachs disease. *Lancet* 2:1195, 1969.

35. Hultberg B, Ockerman PA: Artificial substrates in the assay of acid glycosidases. *Clin Chim Acta* 39:49, 1972.

36. Ikonne JU, Rattazzi MC, Desnik RJ: Characterization of hex -S, the major residual β -hexosaminidase activity in type O GM₂-gangliosidosis. *Am J Hum Genet* 27:639, 1975.

37. Inui K, Wenger DA: Properties of a protein activator of glycosphingolipid hydrolysis isolated from the liver of a patient with GM₁ gangliosidosis type 1. *Biochem Biophys Res Commun* 105:745, 1982.

38. Juit JG, Luckel JC, Nussbaum JL, Stoebner R: La Gangliosidose GM₂ avec déficit complet en β -N-acetylhexosaminidase ou maladie de Sandhoff. *Arch Franc Ped* 30:29, 1973.

39. Kaback MM, O'Brien JS: Tay-Sachs: Prototype for prevention of genetic disease. In: *Medical Genetics*. VA McKusick, R Claiborne (Eds.). HP Publishing Co, New York, 1974, p 253.

40. Klenk E: Beiträge zur Chemie der Lipidosen. I. Niemann-Pick'sche Krankheit und amaurotische Idiotie. *Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem* 262:128, 1939/40.

41. Klenk E: Über die Ganglioside, eine neue Gruppe von zuckerhaltigen Gehirnlipoiden. *Z Physiol Chem* 273:76, 1942.

42. Kolodny EH: Sandhoff's Disease: Studies on the enzyme defect in homozygotes and detection of heterozygotes. In: *Sphingolipids, Spingolipidosis and Allied Disorders*. BW Volk, SM Aronson (eds.) Plenum Publishing Corporation, New York, 1972, p 321.

43. Korneluk RG, Mahuran DJ, Neote K, Klavins MH, O'Dowd BF, Tropak M, Willard HF,

Anderson M-J, Lowden JA, Gravel RA: Isolation of cDNA clones coding for the α -subunit of human β -hexosaminidase. Extensive homology between the α - and β -subunits and studies on Tay-Sachs disease. *J Biol Chem* 261:8407, 1986.

44. **Kornfeld S:** Trafficking of lysosomal enzymes in normal and disease states. *J Clin Invest* 77:1, 1986.

45. **Kremer RD de, Boldini CD, Capra AP, Veritier PP, Goldenhersch H, Corbella L, Sembaj A, Martín S, Kremer I, Mass L, Boscoboinik J:** Estimación de la frecuencia de heterocigotos de la Enfermedad de Sandhoff en una población argentina de alto riesgo. *Medicina* 47:455, 1987.

46. **Kresse H, Fuchs W, Glossl J, Holtfrerich D, Gilberg W:** Liberation on N-acetylglucosamine-6-sulfate by human β -N-acetylhexosaminidase A. *J Biol Chem* 256:12926, 1981.

47. **Kytzia HJ, Hinrichs U, Sandhoff K:** Diagnosis of infantile and juvenile forms of GM2 gangliosidosis variant O. Residual activities toward natural and different synthetic substrates. *Human Genetics* 67:414, 1984.

48. **Kytzia H-J, Sandhoff K:** Evidence for two different active sites on human β -hexosaminidase A. Interaction of GM₂ activator protein with β -hexosaminidase A. *J Biol Chem* 260:7568, 1985.

49. **Laberge C, Dallaire L:** Genetic aspects of tyrosinemia in the Chicoutimi region. *Canad Med Ass J* 97:1099, 1967.

50. **Lalley PA, Rattazzi MC, Shows TB:** Human β -D-N-acetylhexosaminidases A and B: Expression and linkage relationships in somatic cell hybrids. *Proc Natl Acad Sci USA* 71:1569, 1974.

51. **Landa CA, Maccioni HJF, Caputto R:** Disposition of gangliosides and sialosylglycoproteins in neuronal membranes. *J Neurochem* 37:813, 1981.

52. **Landa CA, Maccioni HJF, Caputto R:** The site of synthesis of gangliosides in the chick optic system. *J Neurochem* 33:825, 1979.

53. **Leeden RW:** Gangliosides of the neuron. *Trends Neurosci* 8:169, 1985.

54. Leeden RW: Ganglioside structures and distribution: Are they localized at the nerve endings? *J Supramol Struct* 8:1, 1978.
55. Leeden WR, Salsman K: Structure of the Tay-Sachs ganglioside. *Biochemistry* 4:2225, 1965.
56. Li S-C, Hirabayashi Y, Li Y-T: A protein activator for the enzymic hydrolysis of GM2 ganglioside. *J Biol Chem* 256:6234, 1981.
57. Li S-C, Li Y-T: An activator stimulating the enzymic hydrolysis of sphingoglycolipids. *J Biol Chem* 251:1159, 1976.
58. Li Y-T, Li S-C: Activator proteins for sphingolipid hidrolisis-In *The Enzymes*, 3rd Edition, Volume 16, Ed: PD Boyer, Academic Press, New York, p. 427, 1983.
59. Lo CHH, Kritchevsky D: Physical properties of human serum hexosaminidases A and B: studies in normal and cancer patients. *Clin Chim Acta*: 95:105, 1979.
60. Lowden JA: Evidence for a hybrid hexosaminidase isoenzyme in isoenzyme in heterozygotes for Sandhoff Disease. *Am J Hum Genet* 31:281, 1979.
61. Lowden JA, Ives EJ, Keene DL, et al: Carrier detection in Sandhoff Disease. *Am J Hum Genet* 30:38, 1978.
62. Lowden JA, Mahuran D, O'Dowd B, Gravel R, Tsui F: The intermediate hexosaminidases of placenta and their relationship to precursor processing, in Barranger JA, Brady RO (eds): *The Molecular Basis of Lysosomal Storage Disorders*. Orlando, Academic, 1984, p 257.
63. Ludolph T, Paschke E, Glössl J, Kresse H: Degradation of keratan sulphate by N-acetylhexosaminidases A and B. *Biochem J* 193:811, 1981.
64. Mahuran D, Novak A, Lowden JA: The lysosomal hexosaminidase isozymes. *Cur Top Biol Med Res* 12:229, 1985.
65. Mahuran DJ, Tsui F, Gravel RA, Lowden JA: Evidence for two dissimilar polypeptide chains in the $\beta 2$ subunit of hexosaminidase. *Proc Natl Acad Sci USA* 79:1602, 1982.

66. **Makita A, Yamakawa T:** The glycolipids of the brain of Tay-Sachs disease. The chemical structure of globoside and main ganglioside. *Jpn J Exp Med* 33:361, 1963.
67. **Matsuura F, Nunez HA, Grabowski AG, Sweeley CC:** Structural studies of urinary oligosaccharidem from patients with mannosidosis. *Arch Biochem Biophys* 207:337, 1981.
68. **McInnes B, Brown CA, Mahuran DJ:** Two small deletion mutations of the Hex B gene are present in DNA from a patient with infantile Sandhoff disease. *Biochim Biophys Acta* 1138:315, 1992.
69. **McInnes B, Potier M, Wakamatsu N, Melacon SB, Klavins MH, Tsuji S, Mahuran DJ:** An unusual splicing mutation in the HEXB gene is asociated with dramatically different phenotypes in patients from different racial backgrounds. *J Clin Invest* 90:306, 1992.
70. **McKusick VA:** Genetic studies in American inbred populations with particular reference to the order Amish. *Israel J Med Sci* 9:1276, 1973.
71. **Miller-Podraza H, Fishman PH:** Effect of drugs and temperature on biosynthesis and trasport of glycospingolipids in cultured neurotumor cells. *Biochim Biophys Acta* 804:44, 1984.
72. **Mitsuo K, Nakano T, Goto I, Tanüke M, Suzuki K:** Juvenile Sandhoff disease: a Japanese patient carrying a mutation identical to that found earlier in Canadian patient. *J Neuro Sci* 98:277, 1990.
73. **Myerowitz R, Piekarz R, Nuefeld EF, Shows TB, Suzuki K:** Human β -hexosaminidase α chain. Coding sequence and hokology ith the β chain. *Proc Natl Acad Sci USA* 82:7830, 1985.
74. **Nakamo T, Suzuki K:** Genetic cause of a juvenile form of Sandhoff disease. Abnormal splicing of beta-hexosaminidase beta chain gen transcript due to a point mutation within intron 12. *J Biol Chem* 264:5155, 1989.
75. **Navon R, Nutman J, Kopel R, et al:** Hereditary heat-labile hexosaminidase B: its implication for recognizing Tay-Sachs genotype. *Am J Hum Genet* 33:907, 1981.
76. **Neote K, McInnes B, Mahuran DJ, Gravel RA:** Structure and distribution of an Alu-type deletion mutation in Sandhoff disease. *J Clin Invest* 86:1524, 1990.

77. Neufeld EF: Natural history and inherited disorders of a lysosomal enzyme, β -hexosaminidase. *J Biol Chem* 264:10927, 1989.
78. Neufeld EF, Lim TW, Shapiro LJ: Inherited disorders of lysosomal metabolism. *Ann Rev Biochem* 44:357, 1975.
79. Ng Ying Kin NMK, Wolfe LS: Oligosaccharides accumulating in the liver from a patient with GM₂ gangliosidosis variant O. *Biochem Biophys Res Comm* 59:837, 1974.
80. O'Brien JS, Okada S, Chen A, Fillerup DL: Tay-Sachs Disease: Detection of heterozygotes and homozygotes by serum hexosaminidase assay. *N Engl J Med* 283:15, 1970.
81. O'Brien JS, Okada S, Macwan Ho, Fillerup DL, Veath ML, Adams K: Ganglioside storage disease. *Fed Proc* 30: 956, 1971.
82. O'Dowd BF, Klavins MH, Willard HF, Gravel R, Lowden JA, Mahuran DJ: Molecular heterogeneity in the infantile and juvenile forms of Sandhoff disease (O-variant GM₂ gangliosidosis). *J Biol Chem* 261:12680, 1986.
83. Ohkura T, Yamashita K, Kobata A: Urinary Oligosaccharides of GM₁-gangliosides. Structures of oligosaccharides excreted in the urine of type 1 but not in the urine of type 2 patients. *J Biol Chem* 256:8485, 1981.
84. Okada S, McCrea M, O'Brien JS: Sandhoff's Disease (GM₂ Gangliosidosis Type 2): Clinical, chemical and enzyme studies in five patients. *Pediatr Res* 6:606, 1972.
85. Okada S, O'Brien JS: Tay-Sachs disease: Generalized absence of a beta-D-N-acetylhexosaminidase component. *Science* 165:698, 1969.
86. Penton E, Poenaru L, Dreyfus JC: Hexosaminidase C in Tay-Sachs and Sandhoff disease. *Biochim Biophys Acta* 391:162, 1975.
87. Potier M, Teitelbaum H, Melancon SB, Dallaire L: Purification and some properties of liver and brain β -N-acetyl-hexosaminidase S. *Biochim Biophys Acta* 566:80, 1979.

88. Proia RL, Soravia B: Gene encoding the human β -hexosaminidase β -chain: Extensive homology of intron placement in the α - and β -chain genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:1883, 1988.
89. Proia RL: Organization of the gene encoding the human β -hexosaminidase α -chain. *J Biol Chem* 262:5677, 1987.
90. Rahmann H, Rosner H, Breer H: A functional model of sialoglyco-macromolecules in synaptic transmission and memory formation. *J. Theoret Biol* 57:231, 1976.
91. Robinson D, Stirling JL: N-Acetyl- β -D-glucosaminidases in human spleen. *Biochem J* 107:321, 1968.
92. Sachs B: A family form of idiocy, generally fatal associated with early blindness. *J Nerv Ment Dis* 21:475, 1896.
93. Sandhoff K: Function and relevance of activador proteins for glycolipid degradación. In *The Molecular Basis of Lysosomal Storage Disorders*. Eds: RO Brady and JA Barranger. Academic Press, London, p. 19, 1984.
94. Sandhoff K: Variation of β -N-acetylhexosaminidase-pattern in Tay-Sachs disease. *FEBS Lett* 4:351, 1969.
- 95 Sandhoff K, Conzelmann E, Neufeld EF, Kaback MM, and Suzuki K: The GM₂ gangliosidosis In *The Metabolic Basis of Inherited Disease* (Scriver C. V., Beaudet AL, Sly WS, and Valle D, eds.), pp1807-1839, 1989, McGraw-Hill, New York.
96. Schwarzmann G, Sandhoff K: Metabolism and intracellular transport of glycosphingolipids *Biochemistry* 29:10865, 1990.
97. Sellinger OZ, Beaufay H, Jacques P, Doyen A, De Duve C: Tissue fractionation studies. 15. Intracellular distribution and properties of β -galactosidase in rat liver. *Biochem J* 74:450, 1960.
98. Serrano A En: *Los Comechingones*. Imprenta de la Universidad de Córdoba, Argentina, 1945.
99. Srivastava SK, Wiktorowicz JE, Awasthi YC: Interrelationship of hexosaminidase A and B:

Confirmation of the common and the unique subunit theory. *Proc Natl Acad Sci USA* 73:2833, 1976.

100. Strecker G, Herlant-Peers M, Fournet B, Montreuil J, Dorland L, Haverkamp J, Vliejenthart FG: Structure of seven oligosaccharides excreted in urine of a patient with Sandhoff disease (GM₂ gangliosidosis-variant O). *Eur J Biochem* 81:165, 1977.

101. Svennerholm L: Chromatographic separation of human brain gangliosides. *J Neurochem* 10:613, 1963.

102. Svennerholm L: In Cellular and pathological aspects of glyco-conjugate metabolism, INSERM 126:21, 1985.

103. Svennerholm L: The chemical structure of normal human brain and Tay-Sachs gangliosides. *Biochem Biophys Res Commun* 9:436, 1962.

104. Suzuki Y, Koizumu Y, Togari H, Ogawa Y: Sandhoff disease: diagnosis of heterozygous carrier by serum hexosaminidase assay. *Clin Chim Acta* 48:153, 1973.

105. Tay W: Symmetrical changes in the region of the yellow spot in each eye of an infant. *Trans Ophthalmol Soc UK* 1:155, 1881.

106. Triggs-Raine BL, Gravel RA: Diagnostic heteroduplexes: simple detection of carriers of a 4-bp insertion mutation in Tay-Sachs disease. *Am J Hum Genet* 46:183, 1990.

107. Usuki S, Hoops P, Sweely CC: Growth control of human foreskin fibroblasts and inhibition of extracellular sialidase activity by 2-deoxy-2,3-dehydro-N-acetyl neuraminic acid. *J Biol Chem* 263:10595, 1988.

108. Vidailhet M, Neimann N, Grignon G, Hartemenn P, Philippart M, Paysant P, Nabet P, Floquet J: Maladie de Sandhof (ganglioside A GM₂ de type 2). Etude clinique, biochimique et anatomo-pathologique. *Arch Franc Ped* 30:45, 1973.

109. Von Figura K, Hasilik A: Lysosomal enzymes and their receptors. *Ann Rev Biochem* 55:167, 1986.

110. **Wakamatsu N, Kobayashi H, Miyatake T, Tsuji S:** Anovel exon mutation in the human beta-hexosaminidase beta subunit gene affects 3' splice site selection. *J Biol Chem* 267:2406, 1992.
111. **Warner TG, De Kremer RD, Applegarth D, Mock AK:** Diagnosis and characterization of GM₂ gangliosidosis type II (Sandhoff disease) by analysis of the accumulating N-acetyl-glucosamynil oligosaccharides with high performance liquid chromatography. *Clin Chim Acta* 154:151, 1986.
112. **Warner TG, De Kremer RD, Sjoberg ER, Mock AK:** Characterization and analysis of branched-chain N-acetylglucosamynil oligosaccharides accumulating in Sandhoff disease tissue. *J Biol Chem* 260:6194, 1985.
113. **Warner T, O'Brien J:** Genetic defects in glycoprotein metabolism. *Annu Rev Genet* 17:395, 1983.
114. **Warner TG, O'Brien JS:** GM₁ gangliosidosis and Sandhoff disease In: *Genetics Errors of Glycoprotein Metabolismo* (Durand P, O'Brien JS, eds) Edi-ermes, Milan and Springer-Verlang, Berlin p. 151, 1982.
115. **Watanabe K:** Biochemical studies on carbohydrates. XXII. Animal β -N monoacetylglucosaminidase. *J Biochem (Tokyo)* 24:297, 1936.
116. **Watts RWE, Gibbs D (1986)(Editors).** Lysosomal storage diseases. Biochemical and clinical aspects. Taylor & Francis, London p. 50.
117. **Yamashita K, Ohkura T, Okada S, Yabuuchi H, Kobata A:** Urinary oligosaccharides of GM₁-gangliosidosis. Different excretion patterns of oligosaccharides in the urine of Type 1 and Type 2 subgroups. *J Biol Chem* 256:4789, 1981.
118. **Yamashita K, Tachibana Y, Mihara K, Okada S, Yabuuchi H, Kobata A:** Urinary oligosaccharides of mannosidosis. *J Biol Chem* 255:5126, 1980.
119. **Yamashita K, Tachibana Y, Takada S, Matsuda I, Arashima S, Kobata A:** Urinary glycopeptides of fucosidosis. *J Biol Chem* 254:4820, 1979.

AGRADECIMIENTOS

A mi familia.

Al Profesor Doctor Alberto Marsal por el estímulo de su certidumbre frente a los comienzos inciertos de resultados.

Al Profesor Doctor Antonio Blanco por el aprendizaje del lenguaje de la Química Biológica en la Cátedra que recibió su ejemplar probidad.

A los profesores extranjeros T. Warner, B. O'Dowd, Don Mahuran y R. Gravel por la amplia colaboración y las oportunidades de participación que me ofrecieron.

La investigación de la EMH fue unipersonal por casi una década. Agradezco a los miembros de mi laboratorio y a los colegas que con posterioridad participaron o colaboraron en los trabajos publicados o no publicados realizados en CEMECO: Catalina D de Boldini, Ana P. de Capra, Irma M. de Levstein, Ernesto Hliba, Natalio Bainttein, Perla K. de Hidalgo, Alicia Giner, Sandra Antonozzi, Silvia Bustos, Liliana Corbella, Irene Givogri, Ana O. Ramirez.

A los Colegas del Valle de Traslasierra por el apoyo brindado en los numerosos viajes efectuados a la región ya sea para ubicar a las familias involucradas como para establecer el nexo con los pobladores nativos.

Al Profesor Doctor Carlos Argaraña, quien me ha permitido romper entre nosotros la falsa antinomia entre la investigación básica y aplicada y dar en sumación de experiencias y capacitaciones el impulso necesario para un crecimiento cualitativo; bajo iguales conceptos y de posterior incorporación, al Profesor Doctor Gustavo Nores.

Al Consejo de Investigación Científicas y Tecnológicas de la Provincia de Córdoba (CONICOR) y al Consejo de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) de la R.A. por los subsidios otorgados.

INDICE ANALITICO

- I. Ampliación del número de controles normales no 83
1. Defecto o Deficiencia de la α -Subunidad de la 4
- 1980 De Kremer R., De Levstein. Medicina (Buenos A 25
- 1985 De Kremer R., Boldini C.D., Capra A.P., Levst 25
- 1985 Tomas G. Warner, Raquel D.de Kremer, Eric R. S 51
- 1986 Tomas G. Warner, Raquel D. de Kremer, Derek A 55
- 1987 Raquel Dodelson de Kremer, C.Depetris de Bold 62
- 1992 Charlotte A. Brown, Beth Mc Innes, Raquel Dod 73
2. Defecto o Deficiencia de la β -Subunidad de la H 4
3. Deficiencia de la Proteína Activadora del Gangl 4
- A**
- A. Autorización de los organismos sanitarios comp 63
- Agradecimientos: 108
- Aplicación Clínica del Conocimiento Genético 4
- B**
- B. Ensayos de la hexosaminidasa sérica: 64
- C**
- C. Función discriminante cuadrática(FDC): 65
- Comentario: 93
- Conclusiones 72
- D**
- Descripción estadística de las actividades de la h 65
- Discusión 68
- Distribución de los N-Acetilglucosamil Oligosacári 52
- E**
- Estado de avance: Resultados Preliminares. 83
- I**
- I.1 Definición de las GM2 Gangliosidosis. Ubicaci 4
- I.2 Entroncamiento histórico de las dos más frecue 5
- I.3 Gangliósidos. Estructura y Función 7
- I.4 Biosíntesis y Transporte 10
- I.5 Catabolismo de los Gangliósidos. Enzimas y Act 12
- I.6 El Sistema de la β -Hexosaminidasa 16
- I.7 Relación catalítica. Especificidad de sustrato 19
- I.8 Defectos Moleculares en las Gangliosidosis GM2 21
- I.9 Mutaciones en locus de la β -subunidad de la HE 23
- II.1 Materiales y Métodos 25
- II.2 Resultados y Discusión 25
- II.2.1 El niño con Enfermedad de Sandhoff. Expresi 25
- II.2.10 Caracterización de dos Hex B gen mutacione 73
- II.2.12 Caracterización de la β -Subunidad de la HE 81
- II.2.2 Características étnicas y procedencia de la 34
- II.2.3 Herencia 35
- II.2.4 Ensayos Enzimáticos 39
- II.2.5 Patología: Óptica y Ultraestructural. 44
- II.2.6 Análisis Químico 45
- II.2.7 Caracterización y análisis de los N-acetilg 51
- II.2.8 Diagnóstico y caracterización de la GM2 Gan 55
- II.2.9 Estimación de la frecuencia de heterocigoto 63
- Incidencia, prevalencia y heterocigosis calculada: 68
- Introducción General en el Lenguaje de los Defectos 3
- M**
- Material y Métodos 63
- Microscopía Electrónica (ME) 44
- Microscopía Óptica (MO) 44
- Mostración de algunos resultados 55
- P**
- Patrón referencial autóctono 65
- Primera Parte 3
- Procedimiento de discriminación cuadrática: 65
- R**
- Referencias 97
- Resultados 65, 75
- RESUMEN 95
- Resumen 72, 80
- S**
- Segunda Parte 24
- T**
- Trabajo presentado parcialmente al XIX Congreso o 80

El Programa de Acción Mundial para las Personas con Discapacidad, de Naciones Unidas, alienta la investigación «orientada a prevenir las causas de la deficiencia». (Párrafo 192.a).

«La diferencia existente entre los países industrializados y los países en desarrollo no debe obstaculizar a una colaboración fructífera, ya que gran parte de los problemas interesan a todo el mundo». (Párrafo 191).

