

Caracterización molecular del gen GBA en pacientes cubanos con enfermedad de Gaucher.

Molecular characterization of the GBA gene in Cuban patients with Gaucher disease.

Ixchel López Reyes^I, Antonio Alejandro Esperón Álvarez^{II}, Kalia Lavaut Sánchez^{III}, Arelys Puerta Díaz^{IV}, Elvia Nelemi Santos González^V, Tamara Rubio González^{VI}, Lidice Reyes Navarro^{VII}, Manuel Gómez Martínez^{VIII}, Arlet María Acanda de la Rocha^{IX}, Teresa Collazo Mesa^X.

Resumen

La enfermedad de Gaucher (EG) es el trastorno relacionado con el depósito lisosomal de mayor prevalencia a nivel mundial. Presenta un patrón de herencia autosómico recesivo y se origina fundamentalmente por mutaciones en el gen GBA, localizado en la región cromosómica 1q21, que codifica la enzima lisosomal ácido β -glucosidasa. En el presente trabajo se describen los resultados obtenidos por el laboratorio de Biología Molecular del Centro Nacional de Genética Médica, La Habana, Cuba, en el análisis del gen GBA en pacientes cubanos con sospecha clínica de la EG. Fueron estudiados siete pacientes no emparentados, caracterizados clínicamente y con diagnóstico bioquímico y/o histológico. Se realizó el estudio de cuatro mutaciones mediante amplificación de secuencias del gen GBA y digestión con enzimas de restricción. En los casos en que ninguna de las mutaciones estudiadas por análisis directo estuvo presente, las muestras se sometieron a cribado de mutaciones y secuenciación de ADN. El análisis molecular permitió identificar la mutación presente en el 100% de los cromosomas analizados. Fueron detectadas las mutaciones L444P, N370S e I403T. El presente estudio estableció una metodología para el diagnóstico por biología molecular de la enfermedad de Gaucher en la población cubana que permite ofrecer un servicio diagnóstico efectivo y rápido en pacientes con sospecha de la enfermedad y en posibles portadores.

Palabras clave: Enfermedad de Gaucher, gen GBA, L444P, N370S, correlación genotipo-fenotipo.

Abstract

Gaucher disease (GD) is the most prevalent lysosomal storage disorder worldwide. It presents an autosomal recessive inheritance pattern and originates mainly from mutations in the GBA gene, located in the 1q21 chromosomal region, which encodes the lysosomal enzyme β -glucosidase. The present work describes the results obtained by the Molecular Biology Laboratory of the National Center of Medical Genetics, Havana, Cuba, in the analysis of the GBA gene in Cuban patients with clinical suspicion of GD. Seven unrelated patients, clinically characterized and with biochemical and/or histological diagnosis, were studied. Four mutations were studied by amplifying GBA gene sequences and restriction enzyme digestion. In cases where none of the mutations studied by direct analysis were present, the samples were subjected to mutation screening and DNA sequencing. Molecular analysis allowed to identify the mutation present in 100% of the analyzed chromosomes. Mutations L444P, N370S and I403T were detected. The present study established a methodology for the diagnosis by molecular biology of Gaucher disease in the Cuban population that allows to offer an effective and rapid diagnostic service to patients with suspected disease and to possible carriers.

Keywords: Gaucher disease, GBA gene, L444P, N370S, genotype-phenotype correlation.

^I Licenciada en Biología. Investigadora Agregada. Centro Nacional de Genética Médica. E-mail: ixchel@cngen.sld.cu

^{II} Licenciado en Biología. Investigador Agregado. Centro Nacional de Genética Médica.

^{III} Doctora en Medicina. Especialista de Primer Grado en Medicina General Integral y en Genética Clínica. Instituto de Hematología e Inmunología.

^{IV} Licenciada en Bioquímica.

^V Licenciada en tecnología de la salud. Master en Ciencias. Centro Nacional de Genética Médica.

^{VI} Doctora en Medicina. Especialista de Segundo Grado en Medicina General Integral y en Genética Clínica. Centro Provincial de Genética Médica de Santiago de Cuba.

Introducción

La enfermedad de Gaucher (EG) es el trastorno relacionado con el depósito lisosomal de mayor prevalencia a nivel mundial. Presenta un patrón de herencia autosómico recesivo y se origina fundamentalmente por mutaciones en el gen GBA, localizado en la región cromosómica 1q21. Este gen codifica la enzima ácido β -glucosidasa, una proteína de la membrana lisosomal que cataliza la ruptura del enlace β -glucosídico de la glucosilceramida y produce ceramida y glucosa.¹ La glucosilceramida es un intermediario del metabolismo de glucoesfingolípidos complejos que se encuentra en las membranas biológicas de la mayoría de los tejidos del organismo. Su acumulación, principalmente en células del linaje monocito-macrófago, provoca que las células aumenten de tamaño, se desplace el núcleo hacia la membrana citoplasmática y el citoplasma adquiera apariencia fibrilar, características utilizadas para identificarlas como células Gaucher. Estas células liberan citoquinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias, que contribuyen a la patogenia de la enfermedad.² Otras líneas celulares como las de piel y sistema nervioso pueden verse afectadas en los pacientes, lo cual influye en el amplio rango de fenotipos que comprenden desde la enfermedad letal perinatal hasta la forma asintomática.³ Tradicionalmente se ha clasificado la enfermedad en tres tipos clínicos, teniendo en cuenta la presencia o no de síntomas neurológicos, la severidad y la edad a la que aparece: EG tipo I (no neurológica), EG tipo II (neurológica aguda) y EG tipo III (neurológica crónica).

La EG presenta una amplia heterogeneidad alélica y hasta el momento más de 400 mutaciones han sido reportadas en el gen GBA. No obstante, las dos mutaciones que prevalecen en la mayoría de la poblaciones son c.1226A>G (N370S) y c.1448T>C (L444P). Aunque la correlación genotipo-fenotipo no es exacta, se han establecido patrones que permiten pronosticar la evolución de la enfermedad y proporcionar un tratamiento adecuado a los pacientes desde edades tempranas, para prevenir el desarrollo de complicaciones irreversibles y optimizar el crecimiento y desarrollo de los niños.^{4,5} Por ejemplo, un fenotipo leve está asociado con la variante alélica

N370S.⁶ Mientras que la mutación L444P, se asocia con la EG tipo II y III, en ausencia de una variante alélica leve.^{7,8}

En Cuba, la caracterización molecular del gen GBA se inició en el año 2008, en el Centro Nacional de Genética Médica (CNGM), aunque previamente se realizó el estudio molecular de dos pacientes en el Instituto de Biología Molecular y Celular de Portugal y la Fundación Española para el Estudio y Terapéutica de la Enfermedad de Gaucher (FEETEG).⁹ En el presente trabajo se describen los resultados obtenidos por el laboratorio de Biología Molecular del CNGM, en el análisis del gen GBA en pacientes cubanos con sospecha clínica de la EG.

Métodos

La muestra de estudio estuvo conformada por siete pacientes cubanos no emparentados, diagnosticados clínica, bioquímica y/o histológicamente con la EG. Para establecer la metodología de diagnóstico molecular en los pacientes cubanos con la EG, se tuvo en cuenta la contribución de distintas poblaciones al origen étnico de la población cubana. Las poblaciones de África Central y Occidental, no han sido caracterizadas hasta el momento por técnicas moleculares para el gen GBA. Por ello se seleccionaron para el análisis las mutaciones más frecuentes en la población española: N370S (50,2%), L444P (18,4%), 55del (2,8%) y G377S (2,3%).¹⁰ Las dos primeras variantes alélicas, además, coinciden con las mutaciones más frecuentes a nivel mundial.¹¹ Se emplearon como controles positivos de las mutaciones N370S (en estado heterocigótico) y L444P (en estado homocigótico) muestras de dos pacientes que fueron estudiados en el Instituto de Biología Celular y Molecular de Portugal y por la Fundación Española para el Estudio y Terapéutica de la Enfermedad de Gaucher (FEETEG). El consentimiento informado fue obtenido de los participantes en el estudio, de acuerdo al protocolo aprobado por el comité de ética del Centro Nacional de Genética Médica.

El ADN genómico fue aislado a partir de sangre periférica mediante métodos estándares.¹² Se empleó la técnica de PCR-RFLP para detectar las mutaciones N370S, L444P y G377S según lo descrito en la

^{vii} Técnico en Química Analítica. Centro Nacional de Genética Médica.

^{viii} Técnico en Química Analítica. Centro Nacional de Genética Médica.

^{ix} Licenciada en Bioquímica.

^x Licenciada en Bioquímica. Doctora en Ciencias Médicas. Investigadora Titular. Centro Nacional de Genética Médica.

literatura.¹³⁻¹⁵ Para la variante 55del se utilizó la diferencia en los tamaños de los fragmentos obtenidos por la técnica de PCR.¹⁶ El gen GBA se amplificó con oligonucleótidos específicos que no amplifican el pseudogen. A partir de este fragmento de 7,5 kb fueron amplificados individualmente los exones y secuencias intrónicas adyacentes por PCR-anidado.¹⁷ Para detectar posibles alelos de recombinación, a las muestras que ya tenían definido su genotipo se les realizó el cribado de mutaciones, con excepción de los pacientes 6 y 7, cuyos análisis no habían concluido al momento de la realización de este trabajo.

Cuando las muestras resultaron negativas para las mutaciones estudiadas por análisis directo, se sometieron a cribado de mutaciones mediante la técnica de PCR-SSCP. En caso de localizarse una variante electroforética fueron sometidas, entonces, a la secuenciación bidireccional de ADN por el método de Sanger. Para la corrida electroforética de la secuenciación se utilizó el secuenciador automático ALFexpress II (Amersham Pharmacia Biotech). Los resultados fueron analizados mediante el programa informático del equipo y comparados

con la secuencia de ADN de referencia del gen GBA (GenBank: NG_009783.1) mediante la herramienta de alineamiento de secuencias BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). La mutación detectada por secuenciación fue validada mediante la técnica PCR-RFLP. Para predecir la patogenicidad de las variantes genéticas encontradas se realizó el análisis para evaluar la sustitución de aminoácido mediante las herramientas bioinformáticas SIFT,¹⁸ PolyPhen-2,¹⁹ SNPeffect,²⁰ Mutation Taster²¹ y SNPs3D.²²

Cuando dos mutaciones se detectaron en un paciente se consideraron alelos separados. Lo que se verificó al identificar la mutación en los padres, hermanos o hijos de los pacientes. Con excepción del paciente 7, pues no contamos con miembros de su familia para el análisis.

Resultados

De los siete pacientes estudiados, cinco fueron clasificados como EG tipo I y dos como EG tipo III (Tabla 1).

Tabla 1. Genotipo, edad de inicio y características clínicas de la enfermedad de Gaucher de los siete pacientes cubanos en estudio.

No.	Genotipo	Edad	Tipo clínico	Edad de inicio	Manifestaciones hematológicas	Manifestaciones esqueléticas	Manifestaciones neurológicas	Manifestaciones en otros sistemas
1	N370S/ I403T	15 años	1	6 meses	Anemia, trombocitopenia, leucopenia	Osteomielitis, fractura ósea y miositis	Sin manifestaciones	Hepatoesplenomegalia
2	L444P/ L444P	12 años	3	9 meses	Anemia	Escoliosis	Sin manifestaciones	Hepatoesplenomegalia, estrabismo
3	N370S/ L444P	23 años	1	12 meses	Anemia	Dolores óseos y articulares, claudicación de la marcha	Sin manifestaciones	Hepatoesplenomegalia, hipercalciuria y litiasis vesicular
4	N370S/ L444P	50 años	1	14 meses	Anemia y trombocitopenia severas	Sin síntomas óseos	Sin manifestaciones	Hepatoesplenomegalia
5	N370S/ N370S	33 años	1	6 años	Anemia ligera y trombocitopenia	Sin síntomas óseos	Sin manifestaciones	Hepatoesplenomegalia
6	L444P/ L444P	7 años	3	10 meses	Sin manifestaciones	Sin manifestaciones	Epilepsia y retraso del neurodesarrollo	Hepatoesplenomegalia, estrabismo, retraso del desarrollo pondoestatural y psicomotor
7	N370S/ L444P	39 años	1	Infancia	Anemia	Sin manifestaciones	Sin manifestaciones	Esplenomegalia, sensación de cansancio, falta de aire

El diagnóstico molecular permitió identificar la mutación presente en el 100% de los alelos (14 alelos) del gen GBA analizados (Tabla 2). De las tres mutaciones encontradas, dos, L444P (7 de 14

alelos) y N370S (6 de 14 alelos), están presentes en el 92,86% de los alelos. Las variantes patogénicas G377S y 55del no fueron detectadas.

Tabla 2. Mutaciones encontradas en el gen GBA en pacientes cubanos con la enfermedad de Gaucher.

Mutación	Cambio en el ADNc*	Exón afectado	Cantidad de alelos
L444P	c.1448T>C	10	7
N370S	c.1226A>G	9	6
I403T	c.1325T>C	9	1

*La numeración de los nucleótidos se basa en la secuencia de referencia NM_000157.3.

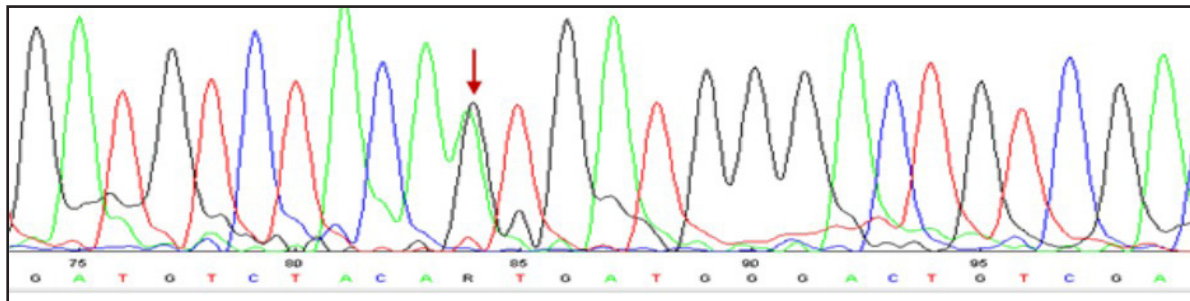
Se identificó el genotipo en los siete casos índice estudiados (Tabla 1). El análisis directo de las mutaciones permitió determinar las variantes presentes en seis de ellos (un genotipo N370S/N370S, tres N370S/L444P y dos L444P/L444P). El paciente restante, presenta en un alelo la mutación N370S y en el otro alelo una variante no descrita

previamente, I403T²³, que fue hallada mediante cribado y secuenciación de ADN en el exón 9 de GBA (Figura 1). El análisis bioinformático de esta mutación mediante los programas SIFT, PolyPhen-2, SNPeffect, Mutation Taster y SNPs3D la evalúa, en todos los casos, como posiblemente patogénica (Tabla 3).

Tabla 3. Predicción computacional de los cambios provocados a nivel molecular por la mutación I403T y características de las herramientas empleadas en el análisis *in silico*.

Herramienta	Tipo	Análisis	Predicción (I403T)
PolyPhen-2	Secuencia y estructura de la proteína.	Información de secuencia y estructura, combinada con un método Bayesiano.	Probablemente patológica.
SIFT	Secuencia y conservación evolutiva del ADN.	Calcula la probabilidad normalizada de una sustitución dada una secuencia de homología.	Patológica.
SNPs3D	Secuencia y estructura de la proteína.	Basado en modelos de estabilidad y de homología de secuencia proteica.	Afecta la función de la glucocerebrosidasa.
SNPeffect	Secuencia y estructura de la proteína.	Establece el fenotipo de los SNP usando la caracterización y la anotación molecular.	Reduce la estabilidad de la glucocerebrosidasa.
MutationTaster	Aprendizaje supervisado (clasificador Bayes).	Predicción basada en múltiples fuentes, combinada con un clasificador Bayes.	Patológica, afecta las características de la glucocerebrosidasa y provoca cambios en los sitios de empalme.

Figura 1. Electroferogramas del gen GBA. Paciente 1: Secuencia del exón 9 donde se indica (flecha roja) el cambio T>C en la posición 1325* correspondiente a la variante alélica I403T en estado heterocigoto (Lavaut *et al.* 2011).



*La numeración de los nucleótidos se basa en la secuencia de referencia NM_000157.

Discusión

La variedad de mutaciones reportadas en el gen GBA, más de 400 hasta la fecha dificulta el estudio molecular de los pacientes con la EG. No obstante, el análisis molecular del gen GBA permitió identificar el genotipo de los pacientes cubanos en estudio. Aunque debido al tamaño de la muestra analizada, siete pacientes, no podemos referirnos a la frecuencia de las mutaciones detectadas, exponemos, para una comparación preliminar, la distribución de los alelos mutados en pacientes de poblaciones afines.

Por ejemplo, estudios en pacientes españoles refieren gran heterogeneidad en el gen GBA, con una de las mayores frecuencias de la mutación N370S para Europa y una de las menores frecuencias de la mutación L444P a nivel mundial. Ambas variantes se identifican en el 68,7% de los alelos mutados en España.¹⁰

En otras poblaciones hispanoamericanas también se ha detectado gran heterogeneidad del gen GBA como resultado del mestizaje de las poblaciones de la región (Tabla 4).

Tabla 4. Distribución de los alelos más frecuentes relacionados con la enfermedad de Gaucher en poblaciones hispanas.

País	Mutaciones más frecuentes	Cantidad de alelos (Frecuencia de la mutación)	Cantidad de alelos analizados (100%)
Argentina	N370S	29 (46,8%)	62
	RecNciI	13 (21%)	
	L444P	4 (6,5%)	
Brasil	N370S	232 (47,0%)	494
	L444P	134 (27,1%)	
Colombia	N370S	24 (52,2)	46
	L444P	5 (10,9)	
España	N370S	194 (50,2%)	386
	L444P	71 (18,4%)	
Cuba (este estudio)*	L444P	7	14
	N370S	6	

* Debido al tamaño de la muestra analizada (siete pacientes) no nos referimos a la frecuencia de las mutaciones detectadas.

Por ejemplo, en Brasil aunque las dos mutaciones más comunes, N370S y L444P, cubren el 74,1% de los alelos mutados existe un 25,9% de alelos en los que se ha identificado una mutación con menor frecuencia o mutaciones esporádicas no caracterizadas.¹⁴ En Argentina el 67,8% de los

alelos mutados corresponde a las variantes N370S y RecNciI, mientras el 32,2% restante concierne a mutaciones con menor frecuencia o mutaciones esporádicas no caracterizadas. La variante L444P, que usualmente tiene una elevada frecuencia, en la población argentina solo representa el 6,5% de los 62

alelos mutados.²⁴ Mientras en Colombia el 63,1% de los alelos mutados corresponde a las variantes N370S y L444P con un 36,9% de alelos en los que se ha detectado una mutación con menor frecuencia.²⁵

Sin embargo, en los pacientes cubanos estudiados, hasta ahora, no se detecta la heterogeneidad descrita en otras poblaciones para el gen GBA, sino que indican una alta frecuencia de las dos mutaciones más comunes a nivel mundial. La elevada prevalencia de las variantes N370S y L444P en la población de España posiblemente haya influido en que estas mutaciones abarquen la mayor parte del espectro de mutaciones de la población cubana.

Dado el mestizaje de la población cubana²⁶ y el hecho de que los pacientes proceden de distintas regiones del país no es posible un efecto fundador, como sucede en poblaciones cerradas. Por ejemplo, la judía de Europa, donde la mutación N370S es la más frecuente²⁷ o la Norrbottnian de Suiza causada por homocigosis para la mutación L444P.²⁸

En este estudio las relaciones genotipo – fenotipo establecidas confirman el papel protector de la mutación N370S en el desarrollo de complicaciones neurológicas,¹⁰ así como que esta variante en estado homocigótico se asocia con manifestaciones leves de la enfermedad.

El paciente heterocigótico compuesto para las mutaciones N370S/I403T fue clasificado como tipo I (Tabla 1). Esta mutación se localiza en el exón 9 del gen GBA que codifica del residuo aminoacídico 370 al 424, y por ello tiene un papel fundamental en la

formación del dominio I y del dominio catalítico de la enzima²⁹. El análisis bioinformático con distintas herramientas predice su carácter patológico.

Los pacientes que tenían un mismo genotipo (tres N370S/L444P y dos L444P/L444P) presentaron variación fenotípica, lo que confirma que otros factores genéticos y ambientales influyen en la expresión clínica de la EG.³⁰

El genotipo L444P/L444P es el que con mayor frecuencia se encuentra asociado a la EG tipo III.³¹ En nuestro estudio uno de los dos individuos homocigóticos para la variante L444P, clasificados como tipo III, aún no ha desarrollado manifestaciones neurológicas, pero estas pueden aparecer durante el curso de la enfermedad (Tabla 1).

Conclusiones

La metodología seguida para el análisis molecular del gen GBA, PCR-RFLP y PCR-SSCP-Secuenciación, resultó efectiva para la confirmación del diagnóstico clínico de la enfermedad en los siete pacientes analizados. Se determinó el genotipo GBA de los pacientes estudiados y se identificaron tres mutaciones relacionadas con la EG. Estos resultados contribuyen al establecimiento de las bases moleculares de la EG en los pacientes cubanos. Además, permiten pronosticar la evolución de la enfermedad de acuerdo al genotipo del individuo enfermo, y proporcionar un tratamiento adecuado a estos desde edades tempranas, mejorando así su calidad de vida.

Referencias bibliográficas

1. Meivar-Levy I, Horowitz M, Futerman A. Analysis of glucocerebrosidase activity using N-(1-[14C hexanoyl]-D-erythroglucosyl)phingosine demonstrates a correlation between levels of residual enzyme activity and the type of Gaucher disease. *Biochem. J.* 1994; 303: 377-82.
2. Harmanci O, Bayraktar Y. Gaucher disease: New developments in treatment and etiology. *World J. Gastroenterol.* 2008; 14(25): 3968-73.
3. Cox TM. Gaucher disease: clinical profile and therapeutic developments. *Biol. Targets Ther.* 2010; 4: 299-313.
4. Baldellou A, Andria G, Campbell PE, Charrow J, Cohen IJ, Grabowski GA, *et al.* Paediatric non-neuronopathic Gaucher disease: recommendations for treatment and monitoring. *Eur. J. Pediatr.* 2004; 163: 67.
5. Mistry PK, Deegan P, Vellodi A, Cole JA, Yeh M, Weinreb NJ. Timing of initiation of enzyme replacement therapy after diagnosis of type 1 Gaucher disease: effect on incidence of avascular necrosis. *Br J Haematol.* 2009; 147(4):561-70.
6. Beutler E, Gelbart T. Glucocerebrosidase (Gaucher Disease). *Hum. Mutat.* 1996; 8: 207-13.
7. Koprivica V, Stone DL, Park JK, Callahan M, Frisch A, Cohen IJ, *et al.* Analysis and Classification of 304 Mutant Alleles in Patients with Type 1 and Type 3 Gaucher Disease. *Am. J. Hum. Genet.* 2000; 66: 1777-86.
8. Stone DL, Tayebi N, Orvisky E, Stubblefield B, Madike V, Sidransky E. Glucocerebrosidase Gene Mutations in Patients With Type 2 Gaucher Disease. *Hum. Mutat.* 2000; 15: 181-8.
9. Lavaut K, Núñez A, Nordet I, González A, Svarch E, Machín S, *et al.* Aspectos clínicos, bioquímicos, moleculares y tratamiento de 2 pacientes con enfermedad de Gaucher. *Rev. Cubana Hematol. Inmunol. Hemoter.* 2010; 26(1): 54-61.
10. Alfonso P, Aznarez S, Giralt M, Pocovi M, Giraldo P. Mutation analysis and genotype/phenotype relationships of Gaucher disease patients in Spain. *J. Hum. Genet.* 2007; 52: 391-6.

11. Hruska KS, Lamarca ME, Scott CR, Sidransky E. Gaucher Disease: Mutation and Polymorphism Spectrum in the Glucocerebrosidase Gene (GBA). *Hum. Mutat.* 2008; 29(5): 567-83.
12. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 1988; 16(3): 1215.
13. Beutler E, Gelbart T, West C. The facile detection of the nt 1226 mutation of glucocerebrosidase by 'mismatched' PCR. *Clin. Chim. Acta.* 1990; 194: 161-6.
14. Rozenberg R, Araújo FT, Fox DC, Aranda P, Nonino A, Micheletti C, et al. High frequency of mutation G377S in Brazilian type 3 Gaucher disease patients. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 2006; 39(9): 1171-9.
15. Tsuji S, Choudary PV, Martin BM, Stubblefield BK, Mayor JA, Barranger JA, et al. A mutation in the human glucocerebrosidase gene in neuronopathic Gaucher's disease. *N. Engl. J. Med.* 1987; 316: 570-5.
16. Tayebi N, Stern H, Dymarskaia I, Herman J, Sidransky E. 55-Base pair deletion in certain patients with Gaucher disease complicates screening for common Gaucher alleles. *Am. J. Med. Genet.* 1996; 66: 316-9.
17. Torralba MA, Perez-Calvo JI, Pastores GM, Cenarro A, Giraldo P, Pocovi M. Identification and characterization of a novel mutation c.1090 G>T (G325W) and nine common mutant alleles leading to Gaucher Disease in Spanish patients. *Blood Cells Mol. Dis.* 2001; 27: 489-95.
18. Kumar P, Henikoff S, Ng PC. Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nat. Protoc.* 2009; 4(7): 1073-81.
19. Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, et al. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat. Methods.* 2010; 7(4): 248-9.
20. De Baets G, Van Durme J, Reumers J, Maurer-Stroh S, Vanhee P, Dopazo J, et al. SnpEff 4.0: on-line prediction of molecular and structural effects of protein-coding variants. *Nucleic Acids Res.* 2012; 40(1): 935-9.
21. Schwarz JM, Cooper DN, Schuelke M, Seelow D. MutationTaster2: mutation prediction for the deep-sequencing age. *Nat. Methods.* 2014; 11(4): 361-2.
22. Yue P, Melamud E, Moulton J. SNPs3D: Candidate Gene and SNP selection for Association Studies. *BMC Bioinformatics.* 2006; 7(1): 166.
23. Lavaut K, Rubio T, Collazo T, Esperón AA, Reyes L, Acanda AM. Identification of a novel mutation, I403T, in Cuban type 1 Gaucher disease. *Blood Cells Mol. Dis.* 2011; 46(4): 327.
24. Cormand B, Harboe TL, Gort L, Campoy C, Blanco M, Chamoles N, Chabas A, et al. Mutation Analysis of Gaucher Disease Patients From Argentina: High Prevalence of the RecNciI Mutation. *Am. J. Med. Genet. A.* 1998; 80(4): 343-51.
25. Pomponio RJ, Cabrera-Salazar MA, Echeverri OY, Miller G, Barrera LA. Gaucher disease in Colombia: Mutation identification and comparison to other hispanic populations. *Mol. Genet. Metab.* 2005; 86: 466-72.
26. Marcheco-Teruel B, Parra EJ, Fuentes-Smith E, Salas A, Buttenschön HN, Demontis D, et al. Cuba: Exploring the History of Admixture and the Genetic Basis of Pigmentation Using Autosomal and Uniparental Markers. *Plos Genet.* 2014; 10(7): e1004488.
27. Zimran A, Gelbart T, Westwood B, Grabowski GA, Beutler E. High frequency of the Gaucher disease mutation at nucleotide 1226 among Ashkenazi Jews. *Am. J. Hum. Genet.* 1991; 49: 855-9.
28. Dahl N, Lagerstrom M, Erikson A, Pettersson U. Gaucher disease type III (Norrbotnian type) is caused by a single mutation in exon 10 of the glucocerebrosidase gene. *Am. J. Hum. Genet.* 1990; 47: 275-8.
29. Hoitsema K, Amato D, Khan A, Sirrs S, Francis Y, Choy M. Identification of novel splice site mutation IVS9+1(GNA) and novel complex allele G355R/R359X in Type 1 Gaucher patients heterozygous for mutation N370S. *Meta Gene.* 2016; 9: 47-51.
30. Horowitz M, Elstein D, Zimran A, Goker-Alpan O. New directions in gaucher disease. *Hum. Mutat.* 2016; 37(11): 1121-36.
31. Grabowski GA, Zimran A, Hiroyuki I. Gaucher disease types 1 and 3: Phenotypic characterization of large populations from the ICGG Gaucher Registry. *Am. J. Hematol.* 2015; 90(1): 12-18.