



CENTRO INTERNACIONAL DE ESTUDOS
DE DOUTORAMENTO E AVANZADOS
DA USC (CIEDUS)

TESIS DE DOCTORADO

IMPLEMENTACIÓN DE LOS MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO EN LA ENFERMEDAD DE FABRY

Cristina Melcón Crespo

ESCUELA DE DOCTORADO INTERNACIONAL

PROGRAMA DE DOCTORADO EN INVESTIGACIÓN CLÍNICA EN
MEDICINA

SANTIAGO DE COMPOSTELA

AÑO 2019



DECLARACIÓN DEL AUTOR DE LA TESIS

Implementación de los métodos de diagnóstico en la Enfermedad de Fabry

Dña. Cristina Melcón Crespo

*Presento mi tesis, siguiendo el procedimiento adecuado al
Reglamento, y declaro que:*

- 1) La tesis abarca los resultados de la elaboración de mi trabajo.*
- 2) En su caso, en la tesis se hace referencia a las colaboraciones que tuvo este trabajo.*
- 3) La tesis es la versión definitiva presentada para su defensa y coincide con la versión enviada en formato electrónico.*
- 4) Confirmando que la tesis no incurre en ningún tipo de plagio de otros autores ni de trabajos presentados por mí para la obtención de otros títulos.*

En Vigo, 22 de Abril de 2019.

Fdo Cristina Melcón



AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR / TUTOR DE LA TESIS

Implementación de los métodos de diagnóstico en la Enfermedad de Fabry

D. José Ramón Fernández Lorenzo

Dña. Saida Ortolano

INFORMAN:

*Que la presente tesis, corresponde con el trabajo realizado por Dña. **Cristina Melcón Crespo**, bajo mi dirección, y autorizo su presentación, considerando que reúne los requisitos exigidos en el Reglamento de Estudios de Doctorado de la USC, y que como director de ésta no incurre en las causas de abstención establecidas en Ley 40/2015.*

En Vigo, 22 de Abril de 2019

Fdo. José R. Fernández

Fdo. Saida Ortolano





Tesis Doctoral

Implementación de los métodos de diagnóstico en la Enfermedad Fabry

Autor: Cristina Melcón Crespo

Tutores: José Ramón Fernández Lorenzo
Saida Ortolano

Santiago de Compostela, Abril de 2019



Agradecimientos

En primer lugar, quiero agradecer a mis tutores, el Dr Fernández Lorenzo y la Dra Ortolano su dedicación, supervisión, ayuda y apoyo necesario e imprescindible para la realización de este trabajo. Gracias por embarcarme en este viaje, acompañarme durante el trayecto y guiarme hasta la meta.

Gracias a todos los niños y las familias que han participado en este trabajo, en especial a los 12 niños pertenecientes a nuestra área sanitaria que aceptaron, después de 10 años, continuar el estudio.

Gracias a la Dra Couce y su equipo de la Unidad de Metabolopatías perteneciente al Complejo Hospitalario de Santiago de Compostela por su papel en la realización del estudio de cribado neonatal. En especial querría agradecer al Dr Cristóbal Colón su aportación.

Gracias al Dr Garnelo, excelente profesional y persona, por su colaboración y disposición en la búsqueda de los pacientes del grupo control necesarios para este estudio.

Gracias a mis compañeros y toda la planta de pediatría del Hospital Álvaro Cunqueiro por su ayuda en la búsqueda de pacientes y recogida de muestras.

Gracias al personal de enfermería y auxiliares del Hospital de Día Pediátrico del Hospital Álvaro Cunqueiro por colaborar de forma desinteresada en la extracción de las muestras.

Gracias a la Unidad de Metodología y Estadística del Instituto de Investigación Sanitaria Galicia Sur, en especial a Cristina, por su colaboración en la realización del análisis estadístico.

Gracias a Irene por el análisis de muestras y ayuda en la interpretación de resultados, por su predisposición y diligencia.

En un ámbito personal, querría agradecer la ayuda de mis padres, porque sin ellos hoy no estaría aquí, sin su ejemplo, aliento y apoyo incondicional y continuo a lo largo de toda mi vida, en Salamanca, Oviedo, Madrid y Vigo; esperándome en la elección MIR o acompañándome un 14 de febrero y un 30 de noviembre.

Gracias a mi segunda familia, la que me ha acogido, ayudado y cuidado como una hija más, en especial a Ana, siempre dispuesta a quedarse al cargo de todo y todos.

Gracias a Rodrigo y Ariadna, porque sois una parte de mí, por hacerme disfrutar de todas las horas del día y por entender tan bien las ausencias de mamá. Y el agradecimiento más especial es para ti, Edu. Gracias por soportarme, animarme, ayudarme y sobretodo quererme.



Conflicto de intereses

La determinación de LysoGb3 ha sido financiada por la empresa SANOFI-GENZYME.

El doctorando declara no tener ningún otro conflicto de interés en relación con la tesis doctoral.





Resumen

La Enfermedad de Fabry (EF) es una enfermedad de depósito lisosomal de herencia ligada al cromosoma X, debida a un déficit de α -galactosidasa A (α -GalA) que produce la acumulación de globotriaosylceramide (Gb3) y otros glucoesfingolípidos naturales en el endotelio vascular de diversas células provocando manifestaciones clínicas a nivel oftalmológico, cardiaco, neurológico y renal. La importancia del diagnóstico precoz radica en el inicio temprano (fases presintomáticas) de la terapia enzimática sustitutiva (TES) con el fin de evitar las complicaciones tardías y reducir la morbilidad y mortalidad.

El diagnóstico inicial se realiza determinando la actividad enzimática de α -GalA y en aquellos casos en los que se objetive deficiencia se lleva a cabo la secuenciación del gen *GLA*. Esto no es suficiente para llegar a un diagnóstico de EF preciso en los casos dudosos en los que se hayan detectado defectos genéticos validados hasta la fecha como no patológicos o de significado incierto y se encuentren en fases presintomáticas. Es en estos casos donde el estudio de niveles de mRNA y proteína puede aclarar el diagnóstico y determinar el inicio de TES de forma precoz.

Como parte inicial del estudio se ha llevado a cabo un programa de cribado neonatal de EF en Galicia obteniendo una prevalencia de Enfermedad de Fabry en varones de 0.013% (1:7575).

En aquellos sujetos, provenientes del programa de cribado neonatal de nuestra área sanitaria, diagnosticados de Variantes de Significado Incierto en el gen *GLA* se determinó LysoGb3/mRNA/Cantidad de proteína/patrón de metilación objetivando en alguno de ellos acúmulo de glucoesfingolípidos así como alteraciones en la expresión génica lo que hace conveniente realizar un seguimiento evolutivo de estos pacientes.

Palabras clave: Enfermedad de Fabry, α -galactosidasa A, gen *GLA*, cribado neonatal, GVUS.

Abstract

Fabry's Disease (FD) is an X-linked lysosomal storage disease, due to a deficiency of α -galactosidase A (α -GalA) that produces accumulation of globotriaosylceramide (Gb3) and other natural glucosphingolipids in the vascular endothelium as well as in other cells. FD causes clinical manifestations at several levels such as ophthalmological, cardiac, neurological and renal. The importance of early diagnosis lies in the early onset (presymptomatic phases) of enzyme replacement therapy (ERT) in order to avoid late complications and reduce morbidity and mortality.

The initial diagnosis is made by determining the enzymatic activity of α -GalA and in those cases in which deficiency is determined, the sequencing of the *GLA* gene is carried out. This is not enough to achieve a precise diagnosis of FD in the doubtful cases in which genetic defects have been identified as non-pathological or of uncertain significance and are in the presymptomatic phases. It is in these cases where the study of mRNA and protein levels can clarify the diagnosis and determine the early onset of ERT.

In this study, on one hand, we carried out a neonatal screening of FD in Galicia establishing prevalence of Fabry's Disease in males around 0.013% (1:7575).

On the other hand, those individuals with genetic variants of unknown significance were enrolled in a study to quantify LysoGb3/mRNA/protein and methylation pattern, revealing, in some of them, defects on gene expression, which implies a clinical monitoring of these patients is advisable.

Keywords: Fabry's Disease, α -galactosidase A, gene *GLA*, neonatal screening, GVUS.

Índice general

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Enfermedad de Fabry.....	1
1.1.1 <i>Definición</i>	1
1.1.2 <i>Recuerdo Histórico</i>	1
1.1.3 <i>Etiología y Patogenia</i>	2
1.1.4 <i>Epidemiología</i>	7
1.1.5 <i>Manifestaciones Clínicas</i>	7
1.1.6 <i>Manifestaciones Clínicas en la Infancia</i>	15
1.1.7 <i>Diagnóstico</i>	16
1.1.8 <i>Tratamiento</i>	23
1.1.9 <i>Seguimiento</i>	34
1.2 Cribado Enfermedad de Fabry.....	36
1.2.1 <i>Cribado Neonatal</i>	36
1.2.2 <i>Cribado en otras poblaciones</i>	44
1.3 Variantes de Significado Incierto	50
1.3.1 <i>Variantes en Secuencias Intrónicas</i>	52
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	59
2.1 Hipótesis	59
2.2 Objetivos.....	59
2.2.1 <i>Objetivo Principal</i>	59
2.2.2 <i>Objetivos Secundarios</i>	60
3. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO.....	63
3.1 Relevancia científica de la investigación.....	63
3.2 Relevancia práctica de la investigación.....	64
4. METODOLOGÍA.....	69
4.1 Diseño del estudio	69
4.2 Población de referencia y de estudio	69
4.3 Criterios de selección.....	70
4.3.1 <i>Protocolo de estudio</i>	71
4.4 Procesado de muestras.....	73
4.5 Análisis de los datos	76
4.6 Dificultades y limitaciones del estudio.....	79
4.7 Aspectos Ético-Legales	79
5. RESULTADOS	83

ÍNDICE GENERAL

5.1	Estudio Descriptivo.....	83
5.2	Estudio Caso - Control.....	88
5.2.1	<i>Sujetos a estudio</i>	88
5.2.2	<i>Manifestaciones Clínicas Sujetos</i>	90
5.2.3	<i>Manifestaciones Clínicas Familiares</i>	91
5.2.4	<i>Determinación de LysoGb3</i>	92
5.2.5	<i>Estudio de mRNA</i>	96
5.2.6	<i>Estudio de proteína</i>	99
5.2.7	<i>Estudio de Metilación</i>	100
6.	DISCUSIÓN	107
7.	CONCLUSIONES	125
8.	LÍNEAS FUTURAS	129
9.	BIBLIOGRAFÍA	133
10.	ANEXOS	163
	Modelo de consentimiento informado Estudio Descriptivo	165
	Modelo de consentimiento informado Estudio Descriptivo	166
	Hoja de Recogida de Datos Estudio Caso - Control	167
	Modelo de consentimiento informado Estudio Caso -Control.....	168
	Aprobación del Comité de Ética Estudio Cribado Neonatal.....	169
	Aprobación del Comité de Ética Estudio Caso - Control	170
	Artículo: Newborn screening for Fabry disease in the north-west of Spain.....	171
	Autorizaciones de empleo de imágenes externas	177

Índice de figuras

Figura 1 Cromosoma X-Localización gen <i>GLA</i>	3
Figura 2 Gen <i>GLA</i>	3
Figura 3 Síntesis de la α -GAL.....	4
Figura 4 Función α -galactosidasa dentro del lisosoma.....	5
Figura 5 Progresión natural de la enfermedad de Fabry	8
Figura 6 Relación entre variantes gen <i>GLA</i> y actividad enzimática α -GalA.	17
Figura 7 Esquema de tratamiento del dolor Neuropático en EF.....	33
Figura 8 Publicaciones científicas sobre enfermedad de Fabry.	63
Figura 9 Protocolo de estudio del cribado neonatal.	72
Figura 10 Reacción de la enzima α -GalA.....	74
Figura 11 Representación esquemática de los parámetros estadísticos graficados.....	77
Figura 12 Cronograma del estudio.	84
Figura 13 Resultados del estudio del cribado neonatal	85
Figura 14 GVUS detectadas.	88
Figura 15. Valores LysoGb3 GLOBAL	94
Figura 16. Valores LysoGb3 CASOS	95
Figura 17. Valores LysoGb3 CONTROLES	95
Figura 18. Niveles de transcrito: Datos globales.....	98
Figura 19. Niveles de transcrito: Diferencia entre sexos.....	99
Figura 20. Niveles de Proteína	100
Figura 21. Análisis de metilación de la región promotora <i>GLA</i>	101
Figura 22. Análisis de metilación del entorno p.(Ala143Thr).....	102
Figura 23. Análisis de metilación del entorno p.(Asp313Tyr).....	103
Figura 24. Secuencia Diagnóstica GVUS.	122



Índice de tablas

Tabla 1. Resumen de las manifestaciones clínicas.....	14
Tabla 2. Resumen de manifestaciones clínicas en pacientes con enfermedad de Fabry (recién nacidos-4 años).....	16
Tabla 3. Biomarcadores daño renal/cardíaco.	21
Tabla 4. Hallazgos fisiopatológicos en cada órgano afectado en la enfermedad de Fabry..	22
Tabla 5. Preparados de agalsidasa de disponibilidad generalizada.. ..	28
Tabla 6. Tratamiento complementario en Enfermedad de Fabry.. ..	31
Tabla 7. Seguimiento EF en la edad adulta..	34
Tabla 8. Seguimiento EF en la edad pediátrica..	36
Tabla 9. Cribados neonatales realizados en el mundo.....	42
Tabla 10. Resumen Cribados EF Mujeres 1995-2017.....	45
Tabla 11. Resumen Cribados EF Varones 1995-2017.	45
Tabla 12. Cribados en Población con IRC	47
Tabla 13. Resumen de Cribados Destacados en Población con MCPH	49
Tabla 14. Variantes Intrónicas Patogénicas con afectación en el <i>splicing</i>	55
Tabla 15. Variantes gen <i>GLA</i> halladas en Cribado Neonatal	86
Tabla 16. Datos Sujetos Caso	89
Tabla 17. Datos Sujetos Control	89
Tabla 18. Manifestaciones Clínicas Niños Portadores GVUS	91
Tabla 19. Manifestaciones Clínicas Familiares	92
Tabla 20. Datos LysoGb3 en Sujetos Casos.....	93
Tabla 21. Datos LysoGb3 en Sujetos Control	93
Tabla 22. Datos Nivel de Transcritos en Sujetos Casos	97
Tabla 23. Haplotipos presentes en el estudio	110
Tabla 24. Resumen Variantes gen <i>GLA</i> presentes en el estudio	110
Tabla 25. Equivalencias Nomenclatura Variantes Gen <i>GLA</i>	110



Abreviaturas

ACV: Accidente Cerebrovascular
AIT: Accidente Isquémico Transitorio
DBS: *Dried Blood Spot*
DE: Desviación Estándar
DNA: Ácido Desoxirribonucleico
EF: Enfermedad de Fabry
ECG: Electrocardiograma
 α -GalA: α -galactosidasa A
Gb3: Globotriaosilceramida
GVUS: Variantes genéticas de significado incierto (*Genetic Variants of Unknown Significance*)
HVI: Hipertrofia Ventricular Izquierda
IC: Intervalo de Confianza
IRT: Insuficiencia Renal Terminal
IRC: Insuficiencia Renal Crónica
LysoGb3: globotriaosilesfingosina
MCPH: Miocardiopatía Hipertrófica
mRNA: Ácido Ribonucleico Mensajero
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa
qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real
RM: Resonancia Magnética
RNA: Ácido Ribonucleico
SNP: polimorfismo de un solo nucleótido (*Single Nucleotide Polymorphism*)
TES: Terapia Enzimática Sustitutoria
VPP: Valor Predictivo Positivo
WB: *Western Blot*
WBC: *White blood cell*





1

Introducción



1 Introducción

1.1 ENFERMEDAD DE FABRY

1.1.1 Definición

La Enfermedad de Fabry (OMIM #301500) es una enfermedad de depósito lisosomal. Es una patología hereditaria ligada al cromosoma X y causada por un déficit de α -galactosidasa A (α -GalA, EC 3.2.1.22), una enzima hidrolítica expresada en el lisosoma y codificada por el gen GLA (Xq22, NC_000023.1, mRNA NM_000169.2) (1,2).

La Enfermedad de Fabry (EF) se caracteriza por la presencia de depósitos lisosomales de globotriaosilceramida (Gb3) y otros glucoesfingolípidos naturales relacionados con este, por ejemplo, globotriaosilesfingosina (LysoGb3). El acúmulo de glucosfingolípidos en el endotelio vascular y en diferentes órganos provoca manifestaciones progresivas, como insuficiencia renal, cardiomiopatía hipertrófica, infartos de miocardio y accidentes cerebrovasculares (ACV) en edades tempranas, todas ellas relacionadas con un riesgo grave de mortalidad precoz (3).

1.1.2 Recuerdo Histórico

Las primeras descripciones de la enfermedad de Fabry han sido realizadas en 1898 por dos médicos en Alemania y Gran Bretaña de forma simultánea pero independiente (4,5). El Dr Johan Fabry dermatólogo de Dortmund y el Dr William Anderson cirujano encargado del Departamento de la piel en el Hospital St Thomas en Londres describieron dos pacientes con angioqueratomas (5–7). El Dr Fabry diagnosticó de “angioqueratoma corporal difuso” a un niño de 13 años con una lesión purpúrica en cuyo análisis objetivó aneurismas de vasos pequeños, vegetaciones en la íntima y trombosis de capilares. Además dicho paciente presentaba albuminuria (6). Por su parte el Dr Anderson describió el caso de un paciente de 39 años con múltiples

angioqueratomas y proteinuria en el que sospechó que la causa subyacente fuese una patología vascular (7).

50 años después de estas primeras descripciones, en 1947 se observó en un estudio postmortem el acúmulo de vacuolas anómalas en los vasos sanguíneos y se comenzó a sospechar en una enfermedad de depósito (8). No fue hasta 1953 cuando se realizó el primer diagnóstico pre-mortem de la enfermedad de Fabry (9). En 1963 se objetivó que el material acumulado en una muestra de biopsia renal de un paciente afecto de enfermedad de Fabry estaba compuesto de glucoesfingolípidos, en su mayoría globotriaosilceramida, y se clasificó desde entonces como una enfermedad dentro del grupo de las esfingolipidosis (10). La sospecha de la causa genética como un tipo de herencia ligada al cromosoma X fue descrito por primera vez en 1967 (11). La demostración de la deficiencia enzimática se produjo en 1967 (12) y desde entonces se comenzó a realizar el diagnóstico cuantificando el nivel de actividad enzimática (4). Durante la década de los 70 se investigó en la búsqueda de una terapia enzimática sustitutiva (TES) mediante plasmaféresis (13) y enzima parcialmente purificada proveniente de placenta humana (14). En 1989 se determinó de forma completa la secuencia del gen de la α -galactosidasa (15) y en la década de los 90 se comienzan los estudios clínicos con enzimas recombinantes siendo aprobado su uso por la Agencia Europea del Medicamento y al FDA (Food and Drug Administration) a partir del año 2001 (16). En los últimos años los avances en la enfermedad de Fabry se centran en la investigación de métodos diagnósticos precoces y específicos, establecer adecuadas correlaciones genotipo-fenotipo así como en la búsqueda de nuevos tratamientos eficaces (chaperonas, terapia génica, terapia de reducción de sustrato...) (17–24).

1.1.3 Etiología y Patogenia

La EF consiste en la presencia de variantes en el gen *GLA* que causan una α -GalA malfunctionante y en consecuencia un acúmulo de esfingolípidos que de forma progresiva producen el daño celular.

La enzima α -GalA es una glicoproteína homodimérica codificada por 7 exones del gen *GLA* (GLA MIM No.300644) de 12 Kb localizado en el brazo largo del cromosoma X (Xq22, ver Figura 1 y Figura 2) (25).

1. INTRODUCCIÓN

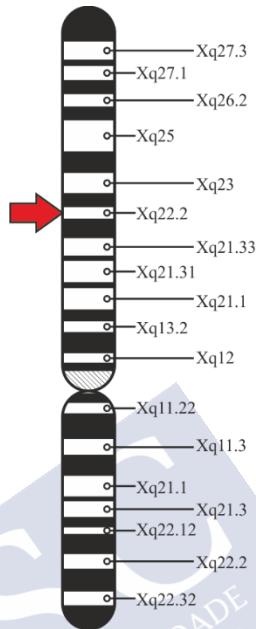


Figura 1 Cromosoma X-Localización gen *GLA*. (Imagen de elaboración propia)



Figura 2 Gen *GLA*. (Imagen de elaboración propia)

El gen *GLA* codifica una proteína precursora compuesta por 429 aminoácidos que se procesa a una glicoproteína funcionante de 370 aminoácidos (26). Esta enzima hidrolítica es sintetizada y glicosilada (se le añade una manosa en posición 6) en el retículo endoplásmico. Posteriormente es transportada mediante un transporte vesicular hacia el aparato de Golgi. Allí es reconocida por la manosa y es fosforilada gracias a una quinasa. Posee por tanto un grupo manosa-6-fosfato que es esencial para ser conducida al lisosoma (27) (ver Figura 3).

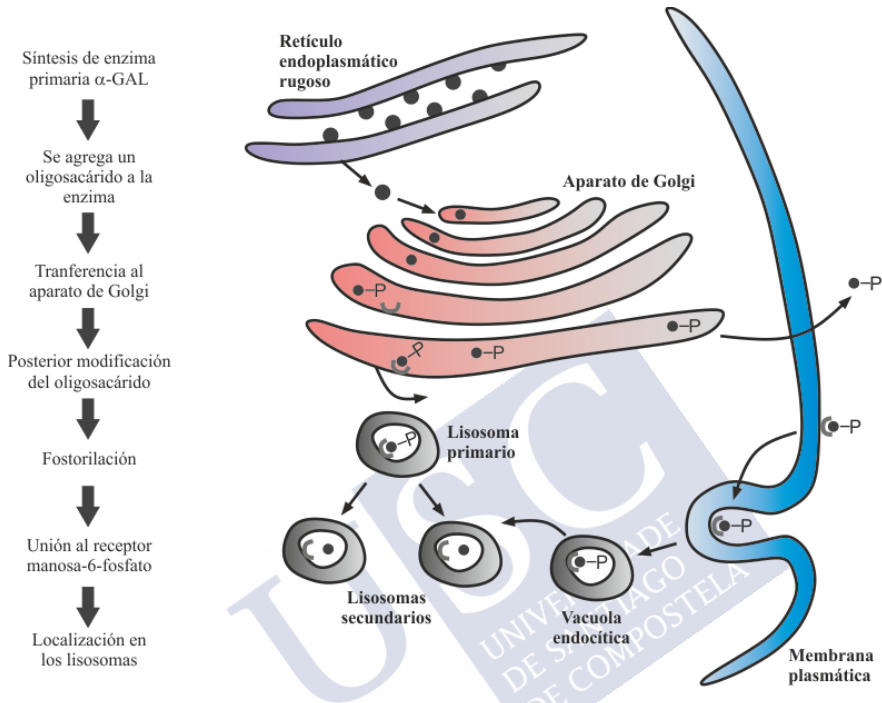


Figura 3 Síntesis de la α -GAL. Figura modificada de Vega-Vega y colaboradores (28). (Con permiso de Publicaciones Permanyer)

La función de la α -GalA dentro del lisosoma es catalizar la hidrólisis del residuo de galactosa terminal de los glucoesfingolípidos (12) (ver Figura 4). El principal sustrato hidrolizado por la α -GalA es globotriaosilceramida (Gb3) pero otros esfingolípidos también son catalizados por dicha enzima como digalactosilceramida, globotriaosilesfingosina (LysoGb3) que es un derivado deacetilado de Gb3 (27).

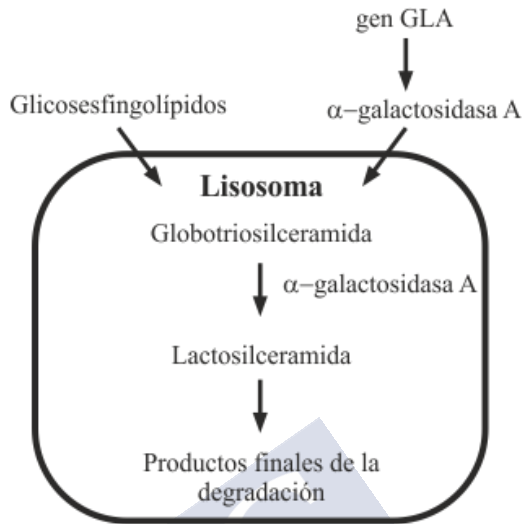


Figura 4 Función α -galactosidasa dentro del lisosoma. (Con permiso de Elsevier)

Según la base de datos HGMD (*The Human Gene Mutation Database*) del Instituto de Genética Médica de Cardiff (29), hasta el 25 de marzo de 2019, se recogieron 966 variantes de *GLA* de las cuales 670 son mutaciones missense/nonsense. También se han descrito deleciones y defectos de *splicing* (26). Las mutaciones pueden afectar al núcleo hidrofóbico o a otras estructuras. Las más frecuentes son las que afectan al núcleo hidrofóbico que producen un mal ensamblaje de la proteína en el retículo endoplásmico impidiendo que ésta sea transportada al aparato de Golgi y así llegar al lisosoma, donde ejercería su función. La actividad de estas proteínas es normal pero no llegan a realizar su función ya que no alcanzan el lisosoma (30). La acumulación de proteínas mal ensambladas activa una serie de cascadas de las que se ha hipotetizado contribuyen al daño celular (31).

A grandes rasgos, la actividad enzimática residual es inversamente proporcional a la afectación clínica. Los pacientes con mayor severidad clínica son portadores de mutaciones que causan ausencia total de actividad α -GalA (26). Las variantes más frecuentes del gen *GLA* con las mutaciones missense/nonsense que con frecuencia se asocian a actividades enzimáticas residuales entre 2 y 25% (26).

A pesar de que el acúmulo de lípidos está claramente demostrado, el mecanismo por el cual dichos lípidos ocasionan el daño celular todavía no está claro. Por ejemplo, en la hipertrofia ventricular izquierda (HVI), el aumento de masa cardiaca debida al acúmulo de lípidos es pequeña comparada con el aumento de masa muscular lo que sugiere que el acúmulo de lípidos debe desencadenar una cascada de eventos que producen en el músculo la hipertrofia (32,33). El acúmulo de Gb3 en las células endoteliales induce estrés oxidativo y altera la adhesión celular (34). También se ha descrito disfunción mitocondrial pero se desconocen las consecuencias (35). Existe evidencia de la patogenia derivada del acúmulo de lysoGb3 ya que los niveles de lysoGb3 dentro del rango encontrado en la EF producen proliferación de células en el músculo liso vascular y activan respuestas fibrogénicas e inflamatorias en el podocito (36–38).

La EF es una enfermedad considerada de herencia ligada al cromosoma X con un alto grado de penetrancia en las mujeres (sólo el 70 de las mujeres portadoras de una variante del gen *GLA* presentan manifestaciones clínicas mientras que cerca del 100 % de los varones portadores de una variante en dicho gen desarrollan afectación clínica) (26). Esto se debe a la inactivación aleatoria del cromosoma X en las mujeres. La afectación en las mujeres depende además del tipo de variante del gen *GLA* /actividad enzimática residual, del patrón de inactivación del cromosoma X en cada órgano. Si el cromosoma inactivado es el portador de la variante patogénica del gen *GLA*, la mujer no presentará manifestaciones clínicas mientras que, si el cromosoma X inactivado es el sano, la enzima α -GalA será producida por el gen *GLA* afectado y por tanto ésta será malfunctionante. En general las manifestaciones clínicas en varones y mujeres portadores de una misma variante del gen *GLA* serán menos severas y de inicio tardío en las mujeres comparadas con los hombres (26).

Algunos autores describen “el Rasgo Fabry” (26) como un factor de riesgo para presentar complicaciones cardiacas, renales o vasculares en pacientes portadores de variantes del gen *GLA* con alta actividad residual de la enzima α -GalA. Dichos individuos en presencia de otros factores genéticos/epigenéticos/modificadores ambientales presentan más riesgo de presentar enfermedad renal y cardiaca.

1.1.4 Epidemiología

La EF es una de las enfermedades de depósito lisosomal de mayor frecuencia en la población con una prevalencia descrita de 1:117000 (39). Sin embargo, estos datos parecen estar ampliamente subestimados, teniendo en cuenta los estudios de cribado neonatal realizados hasta la fecha en los que se describe una prevalencia para la EF de aproximadamente 1:7000 (40), 1:3000 (41).

Existen dos registros mundiales de pacientes con EF, FOS (Fabry Outcome Survey) patrocinado por la farmacéutica Shire y Fabry Registry patrocinado a su vez por la empresa farmacéutica Sanofi-Genzyme.

Además, los resultados de los estudios de cribado para la EF realizados en poblaciones seleccionadas (ej. pacientes con hipertrofia ventricular o con fallo renal no filiados) indican claramente que la presencia de síntomas no específicos facilita que los pacientes con EF no sean correctamente diagnosticados, por lo menos en estadios tempranos de la enfermedad (42–44).

1.1.5 Manifestaciones Clínicas

Se distinguen dos tipos de fenotipos de la EF, la enfermedad de Fabry “clásica” y la de “inicio tardío” o por sus términos en inglés “classic” y “late-onset” (2). La EF tipo clásico se caracteriza por actividad enzimática muy reducida o prácticamente inexistente, inicio de las manifestaciones clínicas desde la infancia con evolución en la edad adulta hacia insuficiencia renal terminal (IRT), hipertrofia ventricular izquierda (HVI) y enfermedad cerebrovascular (45) (ver Figura 5). Aquellos individuos con cierta actividad enzimática residual presentan las manifestaciones clínicas de forma más tardía, en la edad adulta (4^o a 7^o década de la vida) y en muchas ocasiones con afectación casi exclusiva de un solo órgano bien renal o cardíaco (46). Aun así hay una amplia variabilidad clínica incluso en pacientes con una misma variante genética (2) (ver Tabla 1).

La esperanza de vida de los pacientes con EF se reduce en 15-20 años (47). Se estima en 55 años para los varones y 70 para las mujeres (48).

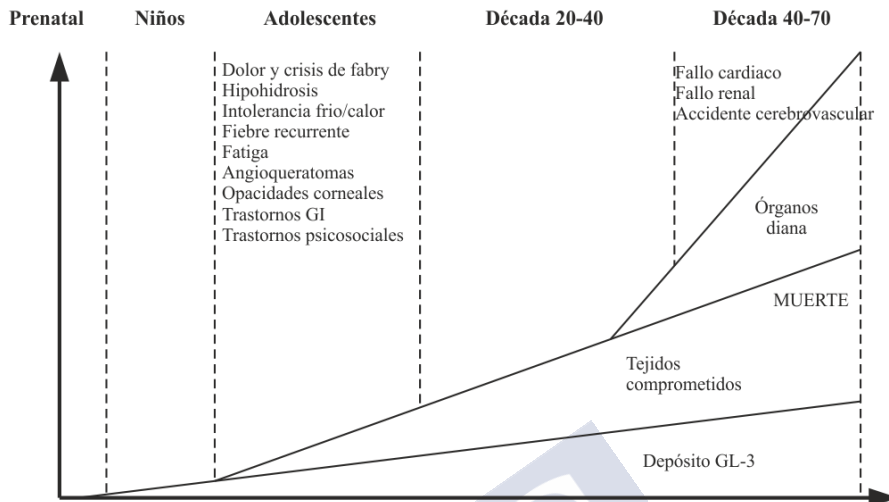


Figura 5 Progresión natural de la enfermedad de Fabry (49). (Licencia Creative Commons)

1.1.5.1 Afectación Cardiovascular

La afectación cardíaca aparece en el 40-60 % de los pacientes incluyendo miocardiopatía hipertrófica (MCPH), arritmias e isquemia miocárdica (50). Es el órgano afectado más importante y constituye la mayor causa de morbi-mortalidad, especialmente en la EF de inicio tardío (2).

La miocardiopatía hipertrófica progresiva con afectación en la función diastólica es la afectación por excelencia (26). Se caracteriza por una hipertrofia ventricular izquierda concéntrica (51) a partir de los 30 años seguida de fibrosis con el desarrollo consiguiente de arritmias severas e insuficiencia cardíaca (32). La función sistólica está conservada hasta estadios avanzados (2). El hallazgo de fibrosis se considera de mal pronóstico debido a su severidad e irreversibilidad (2). La hipertrofia ventricular no guarda relación con el acúmulo de esfingolípidos, como se señaló en el apartado de Etiología y Patogenia 1.1.3, sino con una hipertrofia miocitaria producida por los esfingolípidos u otros mediadores secundarios (32). Existen otros factores que se creen que tiene relación con el desarrollo de la afectación cardíaca en la EF como la activación neurohormonal, factores genéticos/ambientales...(2).

Los defectos de conducción y las arritmias se manifiestan de forma precoz con un acortamiento de intervalo PR debido a la aceleración en la conducción del nodo AV. Posteriormente presentan taquicardias supraventriculares, bradicardias, arritmias ventriculares y muertes súbitas (2). La función microvascular coronaria está alterada y también existe una reducción de la perfusión miocárdica (50). A nivel valvular puede existir afectación tanto insuficiencia como estenosis (26).

A nivel vascular existe un adelgazamiento de la capa íntima y media que ocurre de manera concomitante al desarrollo de hipertrofia ventricular izquierda en ausencia de placas de aterosclerosis lo que sugiere una patogénesis común (50).

La realización de un electrocardiograma (ECG) en la edad adulta es un método para detectar alteraciones de forma precoz (acortamiento PR) aunque es necesario la realización de una ecocardiografía para caracterizar de manera apropiada todas las alteraciones (26) e incluso la realización de una resonancia cardiaca para identificar los defectos de forma más precisa (2).

1.1.5.2 Afectación Renal

La afectación renal se inicia ya en el periodo fetal (2). Las manifestaciones clínicas comienzan hacia los 10 años en forma de microalbuminuria que progresa hacia proteinuria hacia los 20-30 años e IRT precisando terapia renal sustitutiva (diálisis o trasplante) hacia la cuarta-quinta década de la vida (2,26,50). La afectación tubular descrita consiste en hipoestenuria y poliuria (26). A nivel celular se objetiva mayor acumulación de esfingolípidos en los podocitos que en las células endoteliales debido a la ausencia de recambio celular en los podocitos a diferencia de las células del endotelio, que conlleva al acúmulo progresivo de esfingolípidos durante años. La afectación podocitaria se objetiva en la infancia y precede a la aparición de microalbuminuria. Asociado a la pérdida de podocitos se objetiva desarrollo de glomerulonefrosis segmental y focal. La gravedad de dicha glomerulonefrosis junto al grado de proteinuria constituyen factores pronósticos tanto en la historia natural como tras el inicio de la TES (32).

1.1.5.3 Afectación Neurológica

A nivel neurológico podemos hablar de neuropatía periférica, afectación del sistema autónomo y cerebrovascular.

La neuropatía periférica es una de las manifestaciones más frecuentes objetivada, hasta en el 80% (2,50) de los pacientes y una de las más precoces ya que se ha descrito en niños de 3 años (52). Se manifiesta por sensación de quemazón, y disminución de la tolerancia al frío seguida de crisis de dolor agudo (acroparestesias) en las palmas y plantas de manos y pies que se irradia por toda la extremidad de manera bilateral y simétrica (50). Las crisis de dolor pueden estar desencadenadas por fiebre, ejercicio, fatiga, stress o cambios bruscos de temperatura (53). Pueden durar desde horas hasta días enteros y en muchas ocasiones no mejoran con tratamiento analgésico (54). También presentan dolor de forma crónica en forma de disestesias (50). La máxima severidad se produce en la 3^o y 4^o décadas de la vida con una mejoría posterior debido al deterioro de función sensitiva por la gran extensión de la afectación (26). Afecta tanto a fibras mielinizadas como no mielinizadas, ambas de pequeño tamaño por lo que los estudios habituales neurofisiológicos son normales ya que se realizan en fibras de mayor tamaño. Se han descrito depósitos de glicolípidos en perineuro, ganglios sensoriales y células endoteliales. Hay varias hipótesis sobre su patogenia, una de ellas atribuye dichos síntomas al depósito de Gb3 en los ganglios de las neuronas de las raíces dorsales que producirían apoptosis neuronal. También el acúmulo de lysoGb3 en los ganglios y axones de fibras pequeño tamaño afectas puede jugar un papel causal (50).

En cuanto a la afectación del sistema nervioso autónomo se debe a la afectación selectiva de un tipo de fibra (Adelta) con preservación del resto y por tanto de algunas de las funciones del sistema nervioso autónomo (55) La afectación autonómica no es severa (50), a diferencia de la sensitiva previamente descrita. La hipo/anhidrosis objetivada afecta entre 50 % de los varones y 30 % de las mujeres (27) pero es uno de los síntomas precoces (56). También presentan afectación en la contracción pupilar, disminución en la formación de la saliva y de las lágrimas, afectación a la motilidad intestinal y alteraciones en el ritmo

cardíaco así como disminución en la reacción cutánea a la histamina (57).

La afectación cerebrovascular incluye la presencia de infartos, accidentes isquémicos transitorios (AIT), cefaleas, vértigo y demencia vascular (2,50). El infarto puede llegar a ser incluso la primera manifestación de la enfermedad y se han descrito casos en niños (58). Está descrita una prevalencia entorno al 7% de los varones y 4% de las mujeres (59,60) se cree que la EF es la casusa de un porcentaje de infartos criptogénicos (61). La causa de esta afectación cerebrovascular es resultado de una disfunción sistémica vascular multifactorial que incluye acumulación progresiva de Gb3 en las células endoteliales y en el músculo liso de los vasos con progresiva estenosis y oclusiones así como dilataciones en las pequeñas arterias (62), proliferación de músculo liso (36,63) y estado pretrombótico. Dicho estado pretrombótico es consecuencia de una disfunción endotelial (64), una ectasia vascular (65) y un aumento del flujo cerebral (66). Se han encontrado depósitos de glucolípidos en las neuronas de las neuronas del tronco del encéfalo, hipotálamo, amígdala, hipocampo y córtex entorrinal (63). Si bien los infartos ocurren en un porcentaje pequeño de pacientes con EF, las alteraciones en la neuroimagen se objetivan hasta en el 52% de pacientes de 55 años (67) y también han sido descritas en la infancia (68). Existe un hallazgo característico de la EF, el “signo pulvinar” que es objetivado hasta en el 23% de los pacientes con EF hacia los 30 años y es la traducción del aumento de flujo en la circulación posterior (69–72). Otros hallazgos encontrados en pacientes asintomáticos (70) son lesiones en materia blanca periventricular, microhemorragias, infartos corticales de la materia gris, infartos lacunares profundos y malformación Arnold Chiari tipo 1 (69,73). A pesar de que la distribución de las alteraciones se puede encontrar en cualquier localización predomina la afectación posterior.

1.1.5.4 Afectación Dermatológica

Una de las manifestaciones más frecuentes son los angioqueratomas ya presentes en el 66% de los varones a los 19 años (45). Se describen como lesiones rojo oscuro/azul oscuro en las capas superficiales de la piel, pueden estar ligeramente sobreelevadas y no

desaparecen con la presión, también se puede objetivar leve hiperqueratosis en lesiones muy extensas (1).

Las localizaciones típicas son el tronco, los brazos la zona periumbilical y los genitales (46) de forma bilateral (1).

El número y el tamaño de la lesiones cutáneas aumenta con la edad y la presencia de dichas lesiones se correlaciona con la severidad de las manifestaciones sistémicas (74).

1.1.5.5 Afectación Oftalmológica

La córnea verticilata es prácticamente una característica obligatoria, ocurre hasta en un 70% de los pacientes (75). Consiste en una opacidad corneal, inferior, coloración crema. Inicialmente se presenta como una lesión difusa en la capa subepitelial, con el tiempo se extiende desde el centro a la periferia (76).

Además, también pueden presentar cambios en los vasos conjuntivales, tortuosidad en los vasos retinianos, opacidades lenticulares, edema palpebral, atrofia óptica, papiledema, nistagmus, oftalmoplejía internuclear y oclusiones venosas retinianas (2). La agudeza visual no se ve afectada de forma habitual si bien se pueden producir pérdidas bruscas de visión en relación a oclusiones arteriales retinianas (50).

Se ha demostrado una relación entre los cambios a nivel ocular y la severidad y el genotipo de la enfermedad (77).

1.1.5.6 Otras Manifestaciones Clínicas

Los depósitos de glucoesfingolípidos en los pequeños vasos intestinales y en los ganglios autonómicos producen episodios de diarrea, náuseas y vómitos y dolores abdominales entre otros (78).

A nivel neuropsiquiátrico se han descrito trastornos del aprendizaje y déficit de memoria (2). La afectación en el estado de ánimo también es una complicación descrita en estos pacientes con una prevalencia estimada 15-62% (79). El deterioro cognitivo se ha descrito hasta en un 29,3 de los pacientes con EF, sin encontrar relación con el tiempo de evolución pero sí con la mayor afectación a nivel cerebrovascular (80).

Se han descrito problemas audiológicos (hipoacusia y tinnitus) en un porcentaje alto de niños (55% niñas y 39 % niños) (81). Se ha

1. INTRODUCCIÓN

descrito una afectación vestibular progresiva en ambos sexos (82) y una relación entre afectación vascular/neuropática y pérdida auditiva en varones (83).

Los pacientes afectados de EF también pueden presentar alteraciones endocrinas, la más común es el hipotiroidismo con anticuerpos negativos (84).

A nivel respiratorio los pacientes con EF presentan con mayor frecuencia obstrucción de la vía aérea (61 % varones y 26 mujeres) (85) que se ha demostrado que mejora tras inicio de TES (86).

A nivel óseo varios estudios han demostrado la existencia de osteoporosis y osteopenia (50 % de los pacientes) llegando a producir fracturas lumbares espontáneas (85,87).



Tabla 1. Resumen de las manifestaciones clínicas (V=Varón, M =Mujer). Modificado de *Thomas y colaboradores (27)*.

Órgano	Síntomas	Detalles	Frecuencia estimada	Edad media inicio (años)
Cardiovascular	Anomalías de conducción	Atrial o ventricular. Puede requerir marcapasos o colocación de un desfibrilador		
	Hipertrofia ventricular izquierda		46-88% (V) 18-28% (M)	38-42 (V) 49,8-55,4 (M)
	Anormalidades valvulares	Regurgitación mitral o adelgazamiento válvula aórtica	29% (V) 48% (M)	
Riñón	Proteinuria		44-84% (V) 33% (M)	20-30
	Fallo renal	Inicialmente presenta hiperfiltración renal evolucionando a IRT	Anormal 47% (V), 35% (M) IRT 17-30,8% (V), 1-3% (M)	Diálisis 36,7 (V) Trasplante Renal 40 (V)
Cerebrovascular	ACV	Aumento de proporción de eventos circulatorios posteriores	6,9% (V) 4,3% (M)	39 (V) 46 (M)
	AIT	Habitualmente precede al ACV. Asintomático detectando en resonancia magnética craneal lesiones en sustancia blanca o tortuosidad vascular.	ACV/AIT: 12-24% (V) 22-27% (M)	38,8 (V) 52 (M)
	Cefalea/Migraña	Asociado con aumento de riesgo ACV	15% (V)	
Piel	Angioqueratoma	Frecuentemente presente en regiones peri-umbilical y genital	71% (V) 17-35% (M)	16,8 años (V)
	Dismorfias faciales	Filtrum corto, prominencia supraorbitaria, nariz bulbosa	56% (V)	
	Hipohidrosis	Pueden presentar hiperhidrosis	56% (V) 33% (M)	
	Linfedema	Edema tobillo no fluctuante	14% (V) 8% (M)	
Ocular	Córnea		77% (V)	
	Verticilata		73% (M)	
Gastrointestinal	Dolor/Alteraciones de movilidad	Dolor crónico, diarrea, estreñimiento	69% (V) 58% (M)	
Audiovestibular	Pérdida auditiva		41% (V) 23% (M)	29 (V)
	Audiograma patológico	Pérdida auditiva neurosensorial para altas frecuencias	78% (V)	
	Tinnitus		38% (V) 25% (M)	
Neurológica	Dolor neuropático	Desencadenantes: calor, ejercicio, stress, fiebre. Desaparecen en edad adulta 11%	77% (V) 43-70% (M)	9,4-10,1 (V) 14-16,9 (M)

1.1.6 Manifestaciones Clínicas en la Infancia

El acúmulo de esfingolípidos se inicia en el periodo fetal ya que se han detectado depósitos en Gb3 en varones afectados en la cara materna y fetal de la placenta, riñón, plexo mesentérico e hígado. La afectación corneal ha sido detectada a partir de la semana 22 de gestación (68).

En una revisión realizada en 2014 (68) sobre todas las publicaciones existentes en relación a las manifestaciones clínicas presentadas en los primeros años de vida (< 5 años) se encontraron 120 artículos describiendo un total de 41 niños (ver Tabla 2). Los síntomas más frecuentes en esas edades fueron en primer lugar el dolor neuropático seguido de manifestaciones gastrointestinales. Las primeras lesiones en la sustancia blanca se han objetivado en niños de 8 años y no se han encontrado artículos en los que se haya realizado una resonancia magnética (RM) craneal en menores de 5 años (88). A nivel cutáneo se han objetivado inclusiones en forma de cebra en las células endoteliales y epiteliales en un niño de 12 meses sin objetivar angioqueratomas visibles (89). La afectación cardiaca objetivada en la infancia precoz incluye dolor torácico, enfermedad valvular leve, aumento de la masa de ventrículo derecho, acortamiento del intervalo PR e inversión de la onda T indicando inversión en la repolarización (90–92). Síntomas severos a nivel cardiaco no han sido descritos en periodos previos a la adolescencia (91). Se han descrito depósitos de Gb3 en biopsia renal de un niño de 4 años (93), las manifestaciones clínicas renales objetivadas en la infancia temprana son microalbuminuria, proteinuria y disminución del filtrado glomerular (68). La disminución del filtrado glomerular se ha detectado en un niño de 4 años (94). La determinación de la ratio albúmina/creatinina nos puede informar acerca de la progresión de la enfermedad y de la eficacia del tratamiento (68).

En una revisión realizada en 2008 en pacientes pediátricos del Registro de Fabry (94), se objetivó entre un total de 352 niños analizados, una media de edad de comienzo de síntomas entorno a los 6 años en niños y 9 en niñas. El síntoma más común fue el dolor neuropático (58 % niños y 41 % niñas) seguido de los síntomas gastrointestinales. Tan sólo 3 de 352 niños evaluados tenía datos de Insuficiencia renal (estadio II) y otros 3 niños HVI.

Tabla 2. Resumen de manifestaciones clínicas en pacientes con enfermedad de Fabry (recién nacidos-4 años). Modificado de *Laney y colaboradores* (68).

Signos y síntomas relacionados a Fabry	Registro más temprano de síntomas
Hallazgos de depósitos de globotriaosylceramide en biopsias de órganos	Prenatal
Opacidades corneales (Córnea verticillata)	Prenatal / recién nacido
Trastornos gastrointestinales, incluyendo náuseas, vómitos, diarrea, estreñimiento y dolor abdominal	1 año
Retraso en el crecimiento en varones (altura media/peso < percentil 50)	2 años
Acroparestesias intermitentes/dolor neuropático desencadenado por stress/calor/cansancio/ejercicio	2 años
Hipo/anhidrosis	2,5 años
Crisis de Fabry de dolor neuropático agónico, que típicamente comienza en manos y pies y puede irradiar a zonas proximales	2,5 años
Intolerancia al frío, calor y/o al ejercicio	3,5 años
Tortuosidades en vasos retinianos	4,0 años
Tinnitus / vértigo	4,0 años
Disminución del filtrado glomerular	4,0 años
Inversión de onda T en el ECG	4,0 años
Enfermedad valvular cardíaca trivial	4,0 años
Angioqueratomas	4,4 años

1.1.7 Diagnóstico

La sospecha diagnóstica se establece en base a las manifestaciones clínicas previamente descritas (IRT/HVI/ACV de etiologías desconocidas, angioqueratomas, acroparestesias ...) (1). La confirmación diagnóstica en varones se puede realizar determinando la actividad enzimática en leucocitos de la α -galactosidasa, sin embargo, el estudio molecular es importante para establecer el fenotipo clínico, valorar tratamientos específicos (chaperonas) y realizar estudios en el resto de familiares. En las mujeres es necesario el estudio molecular para confirmar la enfermedad ya que la actividad enzimática en sangre puede ser normal aun en presencia de afectación en órganos (95).

1.1.7.1 Actividad enzimática

La determinación de la actividad de la enzima α -galactosidasa se puede realizar en leucocitos de sangre periférica, cultivo de fibroblastos o gotas de sangre seca en papel de filtro (49). Consiste en la realización

de un análisis fluorimétrico utilizando como sustrato 4-metilumbelliferil-alfa -D-galactopiranosida o un espectómetro de masas. Valores inferiores a 1 % son compatibles con un fenotipo clásico mientras que valores por debajo del rango normal (< 25 %) pero mayores al 1% son detectados en varones con variantes atípicas/atenuadas (26,50,95). Algunos autores consideran que el valor de la actividad enzimática es de gran importancia ya que se puede considerar que los varones portadores de variantes genéticas de significado incierto (GVUS) pero con actividad enzimática normal no tiene enfermedad de Fabry (95). Otros autores (96) relacionan la actividad enzimática y el tipo de variante del gen *GLA* teniendo en cuenta que algunas variantes con valores enzimáticos entre el 20 y 50 % precisan de algún otro factor de riesgo para poder producir enfermedad (ver Figura 6).

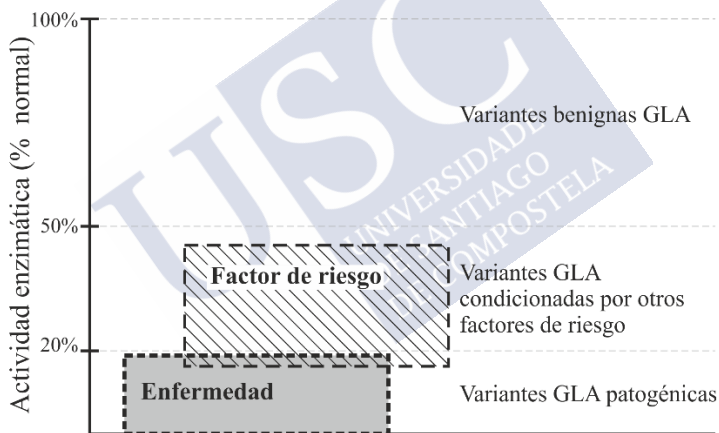


Figura 6 Relación entre variantes gen *GLA* y actividad enzimática α -GalA. Figura modificada de Schiffmann y colaboradores (96). (Con permiso de Springer Nature)

La actividad enzimática en las mujeres no sirve como método de diagnóstico ya que dicho valor puede ser normal en mujeres afectas (49) debido al efecto Lyon que consiste en la inactivación aleatoria del cromosoma X (28,50). Las mujeres heterocigotas son un “mosaico” de células “normales y mutadas” en proporciones variadas en cada órgano (26) según el cromosoma que haya sido inactivado. Por tanto, la determinación de la actividad puede variar dependiendo que cromosoma X se encuentre inactivo en la muestra que se está

determinando sin que dicha muestra sea representativa del resto de las células.

El uso de la determinación enzimática en las mujeres como método de cribado también está en entre dicho actualmente. Yung-Hsiu Lu y colaboradores estiman que el 80 % de las mujeres afectas de EF no son detectadas en un cribado realizado en base a la determinación enzimática y recomiendan el estudio genético como método inicial de cribado (97).

1.1.7.2 Diagnóstico Molecular

El estudio molecular es clave en el diagnóstico en mujeres (26) en las que la determinación de la actividad enzimática no tiene ningún valor diagnóstico como se ha explicado previamente.

Existen más de 900 variantes del gen *GLA* como ya hemos referido previamente (Ver 1.1.3 Etiología y Patogenia). Se pueden clasificar atendiendo a su patogenidad, así pues, existen mutaciones patogénicas que producen fenotipos clásicos, mutaciones patogénicas que producen fenotipos tardíos, variantes de significado incierto y variantes benignas. En general, la severidad de la mutación es inversamente proporcional a la prevalencia de la misma (95). Desde el inicio de los programas de cribado de enfermedad de Fabry se han encontrado numerosas variantes del gen *GLA*. Muchas de ellas no habían sido descritas con anterioridad y su significado patogénico se desconoce por lo que reciben en nombre de variantes de significado incierto. Según el tipo de defecto nos encontramos con ciertas mutaciones con alta probabilidad de causar patogenidad (formación de un codón prematuro de parada que produce la pérdida de la proteína, cambios en la secuencia catalítica que producen proteínas no funcionantes o mutaciones missense que afectan al ensamblaje de la enzima) (50). El método “gold standard” para esclarecer si una mutación es patogénica o benigna consiste en la realización de estudios de expresión *in vitro*, disponibles en laboratorios de investigación especializados (95).

1.1.7.3 Biomarcadores

No existen biomarcadores universalmente reconocidos en la EF (1).

Tradicionalmente se ha utilizado la determinación de Gb3 en plasma como marcador pero dicha determinación de Gb3 tanto en plasma como en orina no disminuye tras el inicio de tratamiento a pesar de existir una mejoría clínica (98) y los cambios en las determinaciones urinarias son aún menos pronunciadas en las mujeres (98,99). No existe una clara correlación entre los valores Gb3 y los síntomas ya que se han detectado valores elevados en niños asintomáticos, valores bajos en mujeres clínicamente afectas (100) e incluso se han descrito valores elevados de Gb3 en pacientes sin EF afectados de patología cardiaca (101). Se está estudiando la posibilidad de realizar determinaciones de Gb3 en muestras de orina en papel de filtro mediante cromatografía de líquidos con espectrómetro de masas en recién nacidos como método de cribado neonatal (102) a pesar de que otros autores han detectado que las concentraciones de Gb3 en menores de 30 días son variables y pueden hallarse valores altos en niños sanos por lo que no deben usarse en menores de 30 días (103). Dichas determinaciones de Gb3 en muestras de orina en papel de filtro ya han sido utilizadas con éxito para realizar cribados en poblaciones de alto riesgo (pacientes con manifestaciones clínicas sugestiva y pacientes con enfermedad renal crónica) (102).

Aunque LysoGb3 es un prometedor biomarcador (104), aún son necesarios más estudios con el objeto de definir bien su fiabilidad y utilidad. Aerts y colaboradores (36) fueron los primeros en el año 2008, en demostrar su utilidad en EF. El incremento relativo en los niveles circulantes de LysoGb3 es muy superior respecto al incremento de Gb3 al comparar pacientes sanos y afectados de EF. No se produce solapamiento de los valores entre varones sanos y afectados y poco solapamiento entre mujeres y controles sanas (36). Si bien la determinación de LysoGb3 en plasma no parece estar relacionado con la presencia de síntomas, ya que está elevado al nacimiento en varones con fenotipo de inicio tardío (105), sí disminuye cuando se inicia la terapia enzimática sustitutiva (36,106,107) y constituye en el momento actual el mejor marcador no invasivo tras inicio de TES (32). Su

determinación en orina sí se ha relacionado con la severidad de la enfermedad (108). En cuanto a la utilización de LysoGb3 como biomarcador de cribado, algunos autores consideran que debido a su determinación elevada en pacientes asintomáticos no puede ser usado para este fin (109) pero en otro estudio (110) los niveles de LysoGb3 $\geq 2,7$ ng/mL se asociaron a afectación clínica en pacientes portadores de variantes de significado incierto. En dichos pacientes también se han descrito valores normales (110,111). También se ha descrito su utilidad en el diagnóstico de mujeres al compararlo con el uso de actividad enzimática (104). Maruyama y colaboradores (112) concluyen tras estudiar 2360 pacientes con fenotipo sugestivo de EF que el estudio de LysoGb3 es un potencial biomarcador primario de cribado objetivando utilidad tanto en la detección de mujeres con actividad enzimática normal como para confirmar el diagnóstico en sujetos con variantes de inicio tardío.

Ferreira y colaboradores (100) hipotetizan sobre la posibilidad de utilizar LysoGb3 en plasma como biomarcador precoz en la progresión de la afectación cardíaca y la excreción urinaria de Gb3 como marcador específico de nefropatía. Existen también otros biomarcadores en relación al daño renal y cardíaco (113) que se detallan en la Tabla 3.

En un estudio publicado en 2018 (114) se identificó un perfil de microRNAs en pacientes con EF independiente del tipo de mutación, sexo y edad que también puede ser útil para monitorizar la respuesta al tratamiento. Los microRNAs son moléculas de pequeño tamaño de Ácido Ribonucleico (RNA) no codificante que regulan la expresión génica a nivel post-transcripcional. Los niveles de los microRNAs cambian en relación a determinadas patologías neoplásicas, metabólicas, renales o cardiovasculares.

Tabla 3. Biomarcadores daño renal/cardiaco. Modificada de *Beirão y colaboradores* (113).
 (FG: Filtrado Glomerular; NT-proBNP: fragmento terminal N la prohormona del péptido natriurético cerebral; VI: Ventrículo izquierdo; Hs-cTnT: Estudios de alta sensibilidad para troponina cardiaca; IL6: Interleucina 6; MCP 1: Proteína 1 quimioatrayente de monocitos; MMP-9: metaloproteinasas de matriz 9)

Órgano	Biomarcador	Plasma/Orina	Valor	Disponibilidad	Respuesta a TES
Riñón	Proteinuria	Orina	Lesión Glomerular	Prueba diagnóstica	Disminución
	Podocituria	Orina	Cambios en FG	Prueba diagnóstica	Disminución
	Creatinina	Plasma	Cambios en FG	Prueba diagnóstica	Disminución descenso FG
	Cistatina C	Plasma	Cambios precoces en FG	Prueba diagnóstica	No estudiado
	N-acetil-β-d-glucosaminidasa	Orina	Lesión tubular	Estudios experimentales	No estudiado
	B2-microglobulina	Orina	Lesión tubular	Estudios experimentales	Disminución
	Uromodulina	Orina	Lesión tubular	Estudios experimentales	No estudiado
	α1-microglobulina	Orina	Lesión tubular	Estudios experimentales	Disminución
	Proteína ligada al retinol	Orina	Lesión tubular	Estudios experimentales	Disminución
Corazón	Bikunina	Orina		Experimental	No estudiado
	NT-proBNP	Plasma	Elevado en la enfermedad subclínica. Correlación con la severidad de la cardiomiopatía	Prueba diagnóstica	No estudiado
	Troponina	Plasma	Correlación con aumento del diámetro de pared posterior del VI	Prueba diagnóstica	No estudiado
	Hs-cTnT	Plasma	Correlación con hipertrofia de VI y con la cantidad de fibrosis de VI	Prueba diagnóstica	No estudiado
	IL 6	Plasma	Lesión Cardiaca	Estudios experimentales	Disminución
	MCP 1	Plasma	Lesión Cardiaca	Estudios experimentales	Disminución
MMP-9	Plasma	Lesión Cardiaca	Estudios experimentales	No estudiado	

1.1.7.4 Diagnóstico Anatomopatológico

A nivel anatomopatológico, los depósitos de lípidos acumulados en lisosomas se describen como una estructura laminar, descritos como “Zebra-like” si se visualizan con el microscopio electrónico y con tinción PAS positiva (27)

En la Tabla 4 se detallan los hallazgos fisiopatológicos encontrados según el órgano afecto

Tabla 4. Hallazgos fisiopatológicos en cada órgano afectado en la enfermedad de Fabry. Modificado de *Vega-Vega y colaboradores* (28).

	Células que se pueden afectar por el depósito de Gb-3	Hallazgos fisiopatológicos
Renal	Podocitos, mesangio, endotelio glomerular, epitelio de la cápsula de Bowman, asa de Henle y túbulo distal; músculo liso y endotelio de arterias y arteriolas; células intersticiales.	Esclerosis glomerular, atrofia tubular, fibrosis intersticial.
Cardiaco	Miocardiocitos, células del sistema de conducción, endotelio, músculo liso y fibrocitos valvulares.	Hipertrofia de ventrículo izquierdo, insuficiencia cardiaca, estenosis de vasos epicárdicos, placas de aterosclerosis; vasoespasmo coronario; complicaciones trombóticas y tromboembólicas.
Nervioso	Endotelio vascular, vasa vasorum, neuronas del sistema nervioso central y periférico, incluyendo la raíz dorsal y ganglios autónomos.	Daño isquémico (anormalidades protrombóticas y obstructivas) y fallo metabólico que causa disfunción neuronal, pérdida de fibras mielínicas y amielínicas, leucoencefalopatía multifocal isquémica de pequeños vasos, ectasia de grandes vasos.
Dermatológico	Endotelio vascular, músculo liso, fibroblastos, perineuro, glándulas sudoríparas, epitelio.	Fragilidad capilar y ectasia vascular en la epidermis, adelgazamiento de vasos pequeños alrededor de glándulas sudoríparas.
Oftalmológico	Epitelio corneal, cristalino, endotelio vascular.	Vetas en epitelio corneal, angiopatía de conjuntiva y retina, obstrucción de la arteria central de la retina, disminución en la secreción lagrimal.
Pulmonar	Epitelio de la vía aérea, endotelio vascular, músculo liso.	Estrechamiento de vía aérea, obstrucción capilar.
Gastrointestinal	Endotelio vascular, epitelio del intestino delgado, colon y recto, músculo liso, nervios y ganglios autónomos, neuronas amielínicas y células perineurales.	Estrechamiento de pequeños vasos en el mesenterio.
ORL	Endotelio vascular, músculo liso y células ganglionares.	Estrechamiento u oclusión total de vasos cocleares, neuropatía isquémica auditiva.

1.1.7.5 Diagnóstico prenatal

Es posible el diagnóstico prenatal ya que se puede determinar la actividad de la actividad de la α -galactosidasa A en células coriónicas en la semana 10 de gestación y en células amnióticas a partir de la semana 14 (115).

1.1.7.6 Criterios diagnósticos

Recientemente se ha publicado una guía de práctica clínica multidisciplinar española en la que se recomiendan los siguientes criterios diagnósticos, tanto en hombres como en mujeres, para la EF (116):

- Actividad enzimática α -galactosidasa A en fase líquida < 5% del valor medio de referencia.
- Presencia de una variante patogénica en el gen *GLA*.
- Al menos 1 de los siguientes criterios:
 - Presencia de 1 o más de los signos característicos de EF (dolor neuropático, córnea verticilata, angioqueratoma).
 - Presencia de familiar con diagnóstico definitivo de EF portador de la misma variante en el gen *GLA*.

Se considerará una forma clásica si el sujeto cumple los dos primeros criterios y además presenta alguno de los signos característicos de la EF. Por el contrario, si no presenta alguno de los signos característicos, pero manifiesta afectación en algún órgano diana (corazón, riñón o SNC) además de los dos primeros criterios, se considerará forma no clásica de la EF.

1.1.8 Tratamiento

El tratamiento de la EF se puede secuenciar en tres problemas fundamentales. Por un lado, se trata de paliar la deficiencia enzimática mediante la TES o las chaperonas farmacológicas. Por otro lado se debe pretender actuar sobre el daño tisular utilizando de este modo la terapia coadyuvante específica y por último se debe tratar el fallo orgánico específico (a nivel renal con terapia de sustitución renal, a nivel cardiaco con trasplante cardiaco...) (32).

En 2018 se ha publicado un documento de consenso sobre los objetivos terapéuticos específicos y concretos a conseguir según el órgano afecto y el grado de afectación clínica al diagnóstico (117). En general se debe disminuir e incluso detener la progresión de la enfermedad, mejorar la calidad de vida de los pacientes, revertir los daños a nivel fisiopatológico y minimizar la morbilidad intentando así mismo aumentar la supervivencia (117).

Múltiples estudios clínicos se están realizando en el momento actual. En el registro de ensayos clínicos y estudios observacionales desarrollado por el Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos (118), se registran hasta 142 estudios abiertos en el momento actual, de los cuales 65 son realizados en pacientes < 18 años.

1.1.8.1 Terapia Enzimática Sustitutiva (TES)

La piedra angular en el tratamiento de la EF es la TES (32). Está disponible en Europa desde 2001 y en Estados Unidos desde 2003 (50).

Consiste en la administración intravenosa bisemanal de α -galactosidasa A humana recombinante (agalsidasa). Dicha molécula se une a receptores de la membrana celular (Mannosa-6-fosfato) para ser posteriormente internalizado hacia el lisoma y activarse debido al pH lisosomal bajo (32). Existen dos preparados comerciales: Agalsidasa alfa (Replagal, producido por la farmacéutica Shire) y Agalsidasa beta (Fabrazyme producido por la farmacéutica Sanofi), este último es el único comercializado en Estados Unidos (ver Tabla 5). Ambas proteínas tienen la misma secuencia de aminoácidos que la enzima nativa humana y se diferencian en el patrón de glicosilación (50), ya que se producen en líneas celulares diferentes. Se han realizado múltiples estudios comparando la eficacia de ambos fármacos sin encontrar diferencias significativas (50) si bien se ha demostrado que solo las dosis elevadas que se utilizan con agalsidasa beta (1 mg/Kg/2 semanas) son capaces de eliminar los depósitos de glucoesfingolípidos de los podocitos debido a que dosis menores con tiempos de infusión más rápidos producen una menor actividad enzimática intracelular (119). En un estudio reciente comparando ambas enzimas sugieren una mayor reducción de los depósitos con la utilización de Agalsidasa beta (120). La eficacia de TES ha sido ampliamente demostrada objetivando

la disminución de los depósitos de Gb3, la mejora en la función cardiaca, la estabilización de la función renal así como el impacto favorable en la calidad de vida (121). Su utilización en la edad pediátrica y en la adolescencia sugiere que incluso puede cambiar potencialmente el curso natural de la enfermedad (121).

Para monitorizar la eficacia del tratamiento se debe comprobar la disminución de los depósitos de glucoesfingolípidos y el daño tisular. La disminución de los depósitos de glucoesfingolípidos se puede comprobar de forma invasiva realizando una biopsia del órgano afecto o de forma no invasiva mediante la determinación de LysoGb3 circulante siendo dicha determinación en el momento actual el mejor marcador no invasivo (32) También es posible la determinación de Gb3 en plasma y orina (117). El daño tisular se comprueba realizando estudio de función renal (ratio albúmina/creatinina, Filtrado Glomerular Estimado), ecocardiografía o Resonancia Magnética (RM) cardiaca, Holter Cardiaco, RM cerebral, audiometrías y/o escalas de dolor (32). El índice de Severidad de Mainz (Mainz Severity Score Index) también se utiliza como sistema de monitorización de la mejoría clínica objetivada en pacientes con enfermedad de Fabry clásica que reciben TES (3).

Asociado al uso de TES se ha objetivado la formación de anticuerpos, la mayoría del tipo IgG, que pueden ocasionar desde la neutralización de la actividad enzimática, alteración de la biodisponibilidad o reacciones de hipersensibilidad (27). La frecuencia de aparición de dichos anticuerpos se sitúa en torno a 64 % en varones al administrar Agalsidasa alfa pudiendo incluso no aparecer en mujeres (27) y 88 % en varones (122) y 53 % en mujeres si se utiliza Agalsidasa beta (123). En un estudio reciente comparando ambas enzimas (120) se constató la mayor prevalencia de anticuerpos en aquellos pacientes que recibían tratamiento con Agalsidasa beta (refieren en posible relación a la dosis o a su obtención debido a diferencias en la glicosilación) si bien la progresiva disminución en LysoGb3 no se vería afectada lo que significaría que no tendría relevancia clínica (relacionado con el uso de dosis elevadas que superaría el efecto negativo de la formación de anticuerpos). En aquellos pacientes a los que se les administraba Agalsidasa alfa y desarrollaban anticuerpos sí se objetivaba una

disminución de LysoGb3 menos prominente. Estudios recientes se encaminan hacia la posibilidad de la utilización de terapia inmunomoduladora en pacientes que hayan desarrollado estos anticuerpos (124).

El inicio de TES es un tema importante ya que se debe comenzar con dicho tratamiento tan pronto aparezcan los primeros síntomas y signos ya que la eficacia será mayor si se comienza en etapas tempranas teniendo una eficacia limitada en estadios avanzados (50). Según el último documento de consenso en cuanto al comienzo del tratamiento con TES (95) se recomienda el inicio de TES en todo varón portador de una mutación en el gen *GLA* que provoquen enfermedad típica/clásica independientemente de la edad y de la existencia de sintomatología. Se ha demostrado la evidencia histológica de la acumulación de Gb3 así como el daño celular y vascular en tejido renal en ausencia de manifestaciones clínicas, incluida microalbuminuria, en niños varones portadores de mutaciones con fenotipo clásico (125). En las mujeres portadoras de variantes del gen *GLA* causantes de EF clásica se debe iniciar TES si presentan afectación clínica sugestiva de EF (dolor neuropático, proteinuria/albuminuria, ACV/AIT, afectación cardíaca, gastrointestinal...) y también se debe considerar iniciar TES si presentan datos de laboratorio/imagen que evidencien inicio de daño renal, cardíaco, cerebrovascular (disminución filtrado glomerular, albuminuria persistente, infartos silentes, MCPH, arritmias...). En aquellos pacientes, varones o mujeres, portadores de variantes causantes de EF de inicio tardío o Variantes de Significado Incierto se debe considerar el inicio de TES ante sintomatología compatible con EF o datos de laboratorio/imagen que evidencien inicio de daño renal, cardíaco, cerebrovascular atribuibles a la EF para lo que puede requerir evidenciar acúmulo de Gb3 de forma histológica o bioquímica.

También es importante determinar en qué fases clínicas el tratamiento con TES no se debe iniciar. En 2015 el grupo de trabajo europeo sobre la EF elaboró un documento de consenso sobre el tratamiento con TES y realizó una serie de recomendaciones al respecto de cuando no iniciarlo. Dicho comité de expertos no recomienda iniciar TES en pacientes con importante afectación cardíaca (extensa fibrosis) y en los que la indicación de TES se hace exclusivamente en relación a

1. INTRODUCCIÓN

su patología cardíaca (126). En dicho documento no se llegó a ningún consenso acerca de la no recomendación de inicio de TES en pacientes con IRT.



Tabla 5. Preparados de agalsidasa de disponibilidad generalizada. Modificada de Ortiz y colaboradores (32).

	Agalsidasa- α	Agalsidasa- β
<i>Características del producto</i>		
Naturaleza	Proteína recombinante humana	Proteína recombinante humana
Obtenida de	Células de fibrosarcoma humano	Células CHO
Disponibilidad	Mundial, excluyendo EE.UU.	Mundial y EE.UU.
<i>Ensayos controlados por placebo y seguimiento a largo plazo</i>		
Ensayos fase I para determinar la dosis (mg/kg): dosis estudiada	0,007; 0,014; 0,028; 0,056; 0,1 (dosis única)	0,3; 1,0; 3,0 (5 dosis consecutivas, cada 2 semanas)
Dosis probadas en ensayos controlados por placebo fase II/III (mg/kg/2 semanas)	0,2	1,0
Publicación de los resultados del seguimiento de 10 años de los pacientes incluidos en los ensayos controlados por placebo fase II/III	No	Sí
Pacientes de ensayos clínicos aleatorizados fase II/III que requirieron duplicar la dosis acumulativa (administración semanal) por respuesta clínica subóptima tras la finalización del ensayo	12/41 (29%)	Ninguno reportado
Ensayo controlado por placebo fase IV, criterio de valoración primario: sucesos clínicos graves	No	Sí
<i>Comparación directa</i>		
Ensayo clínico CFDI fase IV alfa 0,2 frente a beta 1 mg/kg/2 semanas. Sucesos clínicos graves por paciente, 8 años de seguimiento	0,65	0,33
<i>Información del prospecto</i>		
Administración	Intravenosa	Intravenosa
Tiempo de infusión (min)	40	>120
Dosis recomendada (mg/kg/2 semanas)	0,2	1,0
<i>Actividad enzimática intracelular en la dosis e intervalos de dosis del prospecto</i>		
Actividad intracelular de alfa-galactosidasa A en leucocitos, AUC durante 2 semanas (media [IC95%], h [nmol/h/mg]) a la dosis recomendada en el prospecto	396 (299-493)	3709 (2517-4900)
<p><i>AUC: área bajo la curva; CFDI: Canadian fabry Disease Initiative (“Iniciativa Canadiense para la enfermedad de Fabry”); CHO; Chinese hámster ovary cells (“células de ovario de hámster chino”); IC: intervalo de confianza.</i></p>		

1.1.8.2 Chaperona

Las Chaperonas son pequeñas moléculas que se unen al sitio activo de la α -galactosidasa A y ayudan su correcto plegado (27). Esto hace que la enzima pueda ser transportada desde el retículo endoplásmico al interior del lisosoma donde pueda ejercer su función (24,27). Por tanto, dichas moléculas solo se podrán utilizar con determinadas variantes del gen *GLA* que causen enzimas con plegados anómalos (denominadas “mutaciones susceptibles”).

La chaperona farmacológica Migalastat (DGJ, 1-deoxygalactonojirimycin, AT1001) (27), ha sido la primera chaperona para la EF aprobada por la Agencia Europea del Medicamento en el año 2016 y en agosto 2018 por la FDA (Food and Drug Administration). Está indicada en pacientes con diagnóstico de EF portadores de mutaciones susceptibles, con filtrado glomerular $\geq 30\text{mL}/\text{min}/1.73\text{m}^2$ y de edad ≥ 16 años en Unión Europea, Suiza, Australia, Korea, Israel y Japón y ≥ 18 años en Estados Unidos y Canadá (24,127). Se administra en monoterapia por vía oral a días alternos (128). Para la detección de dichas mutaciones susceptibles se realiza un ensayo de susceptibilidad de migalastat que consiste en medir el aumento en la actividad de la enzima α -galactosidasa A inducido por migalastat en células portadoras de la variante *GLA* a estudio (127). Se ha estimado que migalastat se podría utilizar en el 30 % del total de pacientes con EF (124). Ha demostrado su eficacia comparada con placebo en el ensayo FACETS con 67 pacientes objetivando disminución en los depósitos de Gb3 renales y en plasma, estabilizando la función renal, disminuyendo la masa cardiaca y mejorando los síntomas gastrointestinales (24,127,129). También se ha constatado su eficacia comparada con TES en el ensayo ATTRACT que incluía 60 sujetos, en el que se detectó similar efecto a nivel de la función renal así como una mayor reducción en la masa cardiaca (24,127,130). En el momento actual se está llevando a cabo un estudio en fase II explorando la terapia combinada (TES+Migalastat) objetivando aumento de la actividad enzimática comparado con TES (124), así como un ensayo clínico para valorar la eficacia en niños mayores de 12 años (Número de identificación del estudio en *ClinicalTrials.gov*: NCT03500094) (118).

1.1.8.3 Otros tratamientos

La terapia génica ofrece la ventaja de la posibilidad de una actividad enzimática continua a diferencia de la terapia intermitente, tipo bolus, de los otros tratamientos (27). Se están desarrollando terapias tanto *ex vivo* (extracción de células madre del paciente afecto, corrección genética y reinfusión) como *in vivo* (introducción de un vector que sobreexpresa la proteína recombinante en el organismo) (27). Asimismo se ha planteado el uso de un vector basado en AAV8 para la edición *in vivo* del locus de la albumina y la expresión específica del alfa galactosidasa A en el hígado (21). Se ha demostrado en modelos de ratón que la inyección del virus produce un aumento de actividad enzimática y disminución de Gb3 (17,18) pero falta todavía la prueba de concepto clínica y datos de seguridad (22).

En relación a la terapia génica *ex vivo* para la enfermedad de Fabry se están desarrollando ya en la actualidad varios ensayos en fase clínica (Número de identificación de los estudios en *ClinicalTrials.gov*: NCT03454893, NCT02800070, NCT03454893). En el ensayo clínico iniciado en 2017 en Canadá por Medin y colaboradores (131) (Número de identificación de los estudios en *ClinicalTrials.gov*: NCT02800070) se ha llevado a cabo un autotransplante de células recombinantes en 3 pacientes varones con EF clásica objetivando hasta el momento datos de seguridad y eficacia (118).

Otros tratamientos en desarrollo son aquellos que pretenden disminuir la generación de esfingolípidos, conocidos como tratamientos de reducción de sustratos (32). Lucerastat (23) es un inhibidor de la enzima glucosilceramida sintasa reduciendo de esta forma la producción de glucoesfingolípidos, su administración es oral e independientemente del tipo de mutación. Actualmente se encuentra en ensayo clínico fase 3 en monoterapia en paciente con EF con la intención de mejorar el dolor neuropático.

La molécula de agalsidasa de vida media prolongada también está siendo desarrollada (32). Recientemente se han publicado los resultados del estudio realizado con la molécula Pegunigalsidasa alfa administrada en 16 pacientes con EF que, tras un año de tratamiento, objetivan un perfil farmacocinético único (vida media en plasma 53-121 horas) así

como menor inmunogenicidad que el resto de moléculas utilizadas habitualmente en TES (132).

1.1.8.4 Tratamiento Complementario

Asociado a la TES y a la terapia con chaperonas se debe realizar el tratamiento “órgano-específico” al que nos referiremos como tratamiento complementario. Según el órgano afecto y las manifestaciones clínicas existirán una serie de tratamientos recomendados y disponibles (Ver Tabla 6), (26,95).

Tabla 6. Tratamiento complementario en Enfermedad de Fabry. Modificada de Schiffmann y colaboradores (26).

Síntomas	Terapia
Arritmias	Desfibrilador Automático Implantable, marcapasos, Anticoagulantes
Insuficiencia cardíaca	Trasplante Cardíaco
Proteinuria	Fármacos inhibidores de la enzima convertidora en angiotensina, bloqueantes receptor angiotensina, control de la tensión arterial.
Insuficiencia renal	Diálisis, trasplante renal
Neuropatía	Antiepiléptico (Carbamacepina, gabapentina, pregabalina...) Evitar desencadenantes.
Afectación cerebrovascular	Antiplaquetarios (Clopidrogrel, ácido acetil salicílico), eliminar factores de riesgo (tabaco, hipertensión arterial, hiperlipidemia..)
Manifestaciones digestivas	Metoclopramida, ranitidina.
Depresión	Tratamiento antidepresivo
Pérdida auditiva	Audífonos, implante coclear
Hipotiroidismo	Tratamiento hormonal sustitutorio

1.1.8.5 Tratamiento en el paciente pediátrico

El TES de la EF debe iniciarse en estadios precoces para actuar sobre cambios patológicos potencialmente reversibles y así conseguir reducir al máximo las consecuencias a largo plazo. El efecto de TES es limitado en estadios avanzados al encontrarnos a nivel molecular con cambios histopatológicos irreversibles como la fibrosis (133). En una revisión publicada en 2018 analizando todas las publicaciones realizadas sobre el uso de TES en la edad pediátrica (134) se comprobó cómo tras el inicio del tratamiento con TES los niveles de Gb3 se redujeron significativamente o incluso se normalizaron. Además, objetivaron

mejoría clínica en relación a los dolores neuropáticos, síntomas gastrointestinales y calidad de vida. De acuerdo con el último consenso sobre el manejo de la EF, el tratamiento con TES en aquellos pacientes varones portadores de una variante del gen *GLA* asociado a un fenotipo clásico debe considerarse independientemente de la edad (95), otras recomendaciones sitúan a entre los 8-10 años el inicio de TES (133). Según el consenso previamente mencionado sobre el uso de TES, las niñas portadoras de una variante del gen *GLA* asociado a un fenotipo clásico deben considerarse iniciar TES si se hallan sintomáticas o aquellas asintomáticas pero que presenten micoalbuminuria, alteraciones en sustancia blanca o hallazgos de afectación cardiaca. Mismas indicaciones se recomiendan en aquellos niños/as portadores de variantes del gen *GLA* de inicio tardío o variantes de significado incierto (95).

En cuanto al tratamiento complementario en la infancia, según las manifestaciones clínicas descritas previamente en la edad pediátrica (1.1.6 Manifestaciones Clínicas en la Infancia), la afectación más frecuente y que mayores consecuencias produce en la calidad de vida de los niños es el dolor neuropático. Además de evitar los posibles desencadenantes (calor, stress...) un adecuado manejo farmacológico es de vital importancia tanto en las crisis de dolor agudo como de forma crónica (133) (ver Figura 7). El resto de tratamientos complementarios descritos previamente (1.1.8.4 Tratamiento Complementario) también deben ser utilizados según las manifestaciones clínicas presentadas.

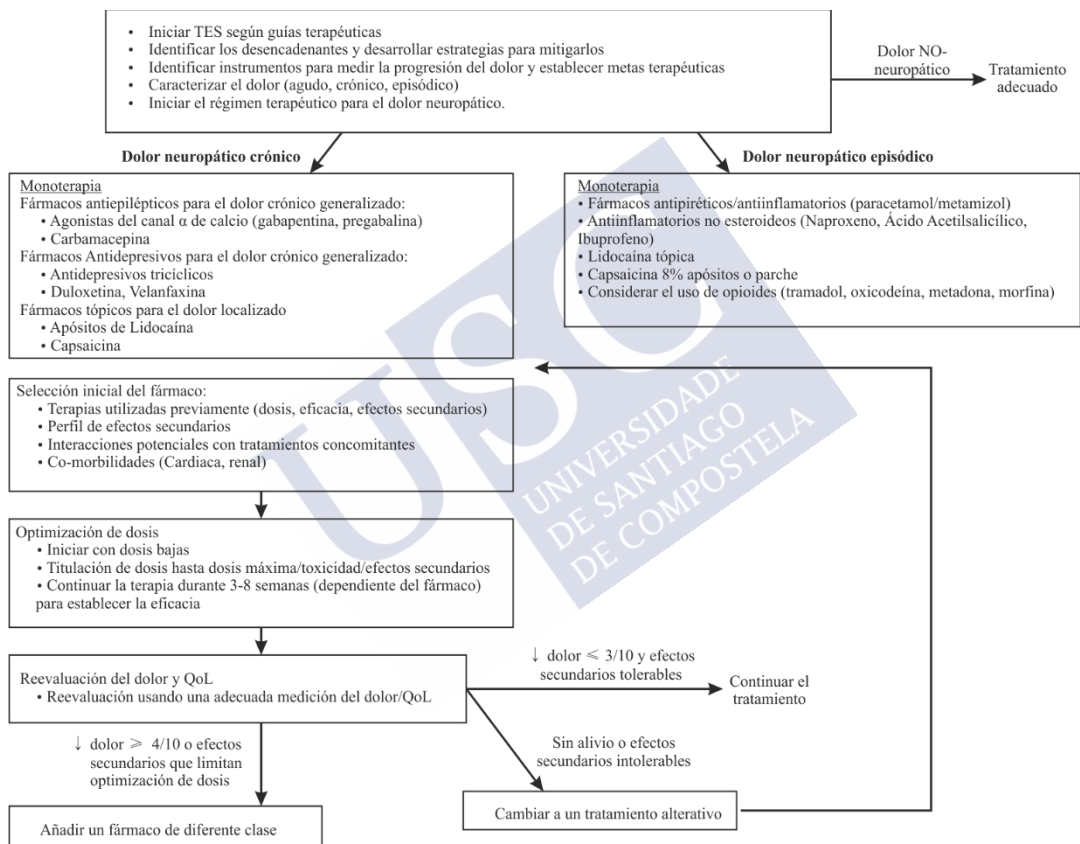


Figura 7 Esquema de tratamiento del dolor Neuropático en EF. (QoL = Quality of life = Calidad de vida). Modificada de *Hopkin y colaboradores* (133). (Con permiso de Elsevier)

1.1.9 Seguimiento

Las últimas recomendaciones sobre el manejo de los pacientes con EF publicadas en 2018 (95) se resumen en la Tabla 7. En dicho documento de consenso también se recomienda realizar una biopsia basal, sobre todo renal con el fin de utilizarlo como marcador para evaluar la progresión de la enfermedad. Dichas recomendaciones de seguimiento están indicadas tanto en varones como en mujeres portadores de variantes patogénicas del gen *GLA* si bien en estas últimas se podrían espaciar los controles en caso de encontrarse asintomáticas y que la expresión predominante sea la del alelo del gen *GLA* no patogénico.

Tabla 7. Seguimiento EF en la edad adulta. Modificada de *Ortiz y colaboradores* (95).

(^aNivel de riesgo basado en Clasificación IRC KDIGO 2012 = Bajo Riesgo IRC estadio G1/2 A1; Riesgo Moderado IRC estadio G3a A1, G1/2 A2; Alto o Muy Alto Riesgo IRC estadio G4/5, G3b A1, G3 A3. IRC= insuficiencia renal crónica (135)).

Órgano	Valoración	Esquema de Monitorización
General	Historia clínica y exploración física completa incluyendo historia familiar, valoración de la calidad de vida, síntomas gastrointestinales, nivel de depresión /ansiedad	En cada visita médica
Renal	Filtrado Glomerular (preferible medido, sino estimado)	Según nivel de riesgo basado en KDIGO 2012: Anualmente si bajo riesgo, cada 6 meses si riesgo moderado y cada 3 meses si riesgo alto o muy alto ^a (FG Medido solo anualmente debido a su complejidad)
	Albuminuria 24 hs (preferible) sino proteinuria 24 hs o determinación en micción aislada ratio proteína/creatinina o albúmina/creatinina	Según nivel de riesgo basado en KDIGO 2012: Anualmente si bajo riesgo, cada 6 meses si riesgo moderado y cada 3 meses si riesgo alto o muy alto ^a
	25 OH Vitamina D	Según indicación clínica (Vitamina D al final otoño/inicio invierno)
	Biopsia renal	Según indicación clínica (alteración en podocitos puede preceder a la albuminuria patológica)
Cardiaco	Tensión Arterial y Ritmo Cardíaco ECG y Ecocardiograma	En cada visita médica Anualmente y según indicación clínica

1. INTRODUCCIÓN

	Monitorizacio Holter 48 hs (se recomienda dispositivo implantable en pacientes con MCPH importante)	Anualmente. Frecuencia variable dependiendo de otros factores de riesgo/detección de arritmias
	RM Cardiaca con Gadolinio	Cada 2 años o si hay evidencia clínica de progresión de la enfermedad
	Péptido Natriurético Cerebral	Anualmente para pacientes con MCPH o bradicardia
Cerebrovascular	RM (Angiografía como primera evaluación en varones mayores de 21 años y mujeres mayores de 30 años) TAC	Cada 3 años y cuando sea necesario clínicamente. En caso de infarto agudo y sólo si RM está contraindicada por uso de Marcapasos
ORL	Audiometría	Cuando sea necesario
Sistema Nervioso Periférico	Evaluación e historia del dolor (uso escalas) Valoración síntomas autonómicos (TA ortoestática) Biopsia de piel	Anualmente (menos frecuente en ancianos) Anualmente Considerar
Pulmonar	Espirometría incluyendo respuesta a broncodilatadores/ejercicio físico, oximetría, radiografía	Cada dos años o antes si hay indicación clínica. Radiografía según indicación clínica
Gastrointestinal	Remitir a Digestivo para realizar endoscopia o pruebas radiográficas	Si los síntomas persisten o empeoran a pesar del tratamiento
Acúmulo Glicolípidos	Determinación en plasma y orina LysoGb3 y Gb3	Al diagnóstico y anualmente
Óseo	Densitometría ósea	Considerar
Oftalmológico	Exploración oftalmológica	Según indicación clínica

En cuanto los pacientes pediátricos, existen algunas guías publicadas en Inglaterra y Francia (133) sin embargo, debido a la falta de biomarcadores precoces de la EF es difícil realizar una guía en la que se refleje una monitorización y manejo óptimo. En la Tabla 8 se detallan las últimas recomendaciones publicadas en 2016 (133).

Tabla 8. Seguimiento EF en la edad pediátrica. Modificada de *Hopkin y colaboradores* (133).

	Valoración	Esquema de Monitorización
General	Exploración Física completa incluyendo calidad de vida/estado de ánimo	Al diagnóstico y cada año
	Genotipo	Al diagnóstico
	Consejo Genético	Al diagnóstico y cuando sea necesario en la edad reproductiva
Renal	Medición Filtrado Glomerular	Al diagnóstico y de forma regular (Mínimo cada año). Si TES cada 6 meses
	Ratio albuminuria/creatinina	Primera orina de la mañana. Cada año
	Biopsia Renal	Si existe indicación clínica
Cardiaco	Tensión Arterial y Ritmo	En cada visita médica
	ECG y Ecocardiograma	Al diagnóstico y cada 2 años (inicio a los 10 años) y cuando esté indicado clínicamente
	RM Cardíaca	No de rutina (útil para diagnóstico fibrosis latente)
	Holter	Si clínica de arritmias. Si se detectan, se deber realizar más frecuentemente
Sistema nervioso central		No de rutina (realizar rápidamente en edad pediátrica si existe algún cambio neurológico potencialmente relacionado con infarto o AIT)
	RM	
Dolor neuropático	Evaluación e historia del dolor (uso escalas)	Al diagnóstico y en cada valoración clínica
Tracto Gastrointestinal	Historia médica con especial atención a hábito intestinal, náuseas/vómitos, aumento de peso, dieta. Evaluación radiográfica o endoscópica puede ser de utilidad para excluir otras causas de dolor abdominal no relacionadas con EF	Al diagnóstico y al menos de forma anual

1.2 CRIBADO ENFERMEDAD DE FABRY

1.2.1 Cribado Neonatal

El cribado neonatal es un programa de salud pública que permite detectar de forma precoz determinadas patologías en recién nacidos.

Los primeros cribados neonatales se desarrollaron en Europa en la década de los años 50 para la detección de fenilcetonuria (136). En 1958 se inició de Cardiff el primer cribado neonatal oficial al implicar a las Autoridades sanitarias (137). A partir de entonces se extendieron por el resto de países europeos no siendo hasta diez años después, en 1968,

cuando comenzaron a realizarse dichos programas de cribado neonatal en España paralelamente en Granada de la mano del Profesor Federico Mayor Zaragoza y en Barcelona gracias a Juan Sabater, Jesús Raventós y la Fundación Juan March (136). Con la creación del grupo de trabajo para la elaboración del Plan Nacional de Prevención de la Subnormalidad en 1976 se iniciaron los pasos para conseguir la cobertura nacional de los planes de cribado neonatal existentes en España, continuando dicha labor en cada comunidad autónoma tras la transferencia de dichas competencias en 1982 a través de los programas autonómicos (136). En el momento actual los Programas de Cribado Neonatal Autonómicos se rigen por la normativa estatal regulada mediante la Orden SSI/2065/2014,¹ en la que se establece la detección de como mínimo 7 enfermedades endocrino-metabólicas (Hipotiroidismo congénito, Fenilcetonuria, Fibrosis quística, Deficiencia de acil-coenzima A-deshidrogenasa de cadena media, Deficiencia de 3-hidroxi-acil-coenzima A-deshidrogenasa de cadena larga, Acidemia glutárica tipo I y Anemia falciforme).

En la Comunidad Autónoma de Galicia el cribado neonatal se puso en marcha en 1978. Progresivamente se han ido incluyendo varias enfermedades y desde el año 2001 se lleva a cabo el cribado neonatal ampliado que se realiza mediante la técnica de la espectrometría tándemas. Dicha técnica consiste en la cuantificación e identificación de moléculas basándose en su masa (138). En el momento actual se realiza la detección de forma precoz mediante el Programa de Cribado Neonatal de las siguientes enfermedades:

1. Hipotiroidismo congénito
2. Alteraciones de los Aminoácidos
 - a. Fenilcetonuria (PKU)
 - b. Leucinosis (MSUD)

¹ Orden SSI/2065/2014 del 31 de octubre (publicada en el Boletín Oficial del Estado número 269; 6 de noviembre de 2014: 91369-91382) Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. Modifica los anexos I, II y III del Real Decreto 1030/2006, de 15 de septiembre, por el que se establece la cartera de servicios comunes del Sistema Nacional de Salud y el procedimiento para su actualización. B.O.E. número 269; 6 de noviembre de 2014: 91369-91382.

- c. Homocistinuria (HCY)
 - d. Tirosinemia tipo I (TYR I)
 - e. Tirosinemia sin clasificar
 - f. Argininemia (ARG)
 - g. Hiperprolinemia (PRO)
 - h. Hidroxiprolinemia
 - i. Hipermetioninemia
 - j. Cistinuria
 - k. Dibásico aminoaciduria
 - l. Cistationinemia
 - m. Alcaptonuria
 - n. Hiperглиcinemia no cetósica
 - o. Citrulinemia
 - p. Histidinemia
3. Alteraciones del Metabolismo de los Ácidos Orgánicos
- a. Acidemias metilmalónicas (MMA)
 - b. Acidemia propiónica (deficiencia de propionil-CoA carboxilasa) (PA)
 - c. Acidemia glutárica tipo I (deficiencia de glutaril-CoA deshidrogenasa) (AGA I)
 - d. Deficiencia de 3-metilcrotonil-CoA carboxilasa (MCC)
 - e. Deficiencia de 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA liasa (HMG)
 - f. Aciduria arginosuccinica
 - g. Aciduria mevalonica
4. Alteraciones del metabolismo de los Ácidos Grasos
- a. Deficiencia de acil-CoA deshidrogenasa de cadena corta (SCAD)
 - b. Deficiencia de acil-CoA deshidrogenasa de cadena media (MCAD)
 - c. Deficiencia de hidroxiacil-CoA deshidrogenasa de cadena larga (LCHAD)
 - d. Deficiencia primaria de carnitina (CUD)
 - e. Aciduria piroglutámica (5-oxoprolinuria) (PG A)
5. Otras Alteraciones
- a. Deficiencia de biotinidasa

- b. Galactosemia clásica (Def. Gal-1-P-uridil-transferasa)
 - c. Galactosemia (Def. Galactoquinasa)
 - d. Galactosemia (Def. UDP.Gal-epimerasa)
 - e. Diabetes mellitus
 - f. Glucosuria
 - g. Acidosis láctica congénita
6. Situaciones benignas o transitorias
- a. Hipertirotropinemia transitoria
 - b. Hiperfenilalaninemia benigna
 - c. Tirosinemia transitoria
 - d. Acidemia metilmalónica transitoria
 - e. Deficiencia parcial de biotinidasa

Es de reseñar que faltaría por incorporar la anemia falciforme, una de las enfermedades consideradas obligatorias por parte de ministerio desde 2014.

El objetivo de un cribado neonatal es, como hemos apuntado previamente, la detección de enfermedades de forma precoz en el recién nacido. Dicha detección temprana hace posible un seguimiento y una intervención terapéutica de forma precoz que modifica el curso clínico y la supervivencia de los afectados, reduciendo por tanto la morbilidad y mortalidad de dicha patología. Estas enfermedades diana del cribado neonatal son del tipo endocrino o metabólico congénitas y no son evidentes clínicamente en sus fases iniciales es por ello que su detección al nacimiento, previo al inicio de los síntomas, permite cambiar el curso de las mismas. Tradicionalmente toda enfermedad susceptible de ser incluida en un programa de cribado neonatal debe cumplir los criterios de Wilson-Junger (139):

- ✓ Debe ser un importante problema de salud.
- ✓ La enfermedad debe cursar con un periodo asintomático y se debe conocer el curso natural de la enfermedad.
- ✓ Debe existir un diagnóstico.
- ✓ Debe haber una prueba de detección y dicha prueba debe ser aceptable para la población.
- ✓ El coste del diagnóstico de un caso positivo debe ser económico

- ✓ Debe tener un tratamiento aceptado para los pacientes diagnosticados y debe existir un consenso sobre quién debe ser tratado.
- ✓ La detección de los casos debe ser un proceso continuo.

Dulín-Íñiguez y Col (138) resumen en 5 puntos los puntos previos:

- ❖ Enfermedad con una morbi/mortalidad grave si no se diagnostica en el periodo neonatal.
- ❖ No es posible detectarla con una exploración física en el periodo neonatal.
- ❖ Debe existir un tratamiento efectivo.
- ❖ Debe poseer una incidencia $>1/10000-15000$ recién nacidos.
- ❖ Debe existir un método de cribado rápido, fiable y bajo coste.

Dichos criterios se han revisado posteriormente y se incluyen otros como son la relación entre la detección precoz y la reducción de la mortalidad o la relación con la supervivencia....(138)

Antes de la ejecución de todo cribado neonatal debe considerarse la relación beneficio/daño ya que la detección en periodo neonatal de dichas enfermedades debe ocasionar un beneficio clínico al paciente.

Los cribados neonatales han experimentado un importante aumento en los últimos años en cuanto a las enfermedades incluidas en ellos en parte debido a la utilización de la espectrometría de masas en tándem como método de determinación. La elevada sensibilidad de la espectrometría de masas y la alta selectividad de los aparatos más recientes hace que se hayan convertido en una herramienta estándar en los laboratorios de cribado y potencian la inclusión de múltiples enfermedades en el cribado neonatal, entre otras las enfermedades lisosomales. Además, la existencia de tratamientos específicos para estas patologías es un incentivo adicional para la introducción de estas enfermedades en el cribado (140).

La enfermedad de Fabry, al igual que otras enfermedades lisosomales, también ha comenzado a formar parte de los cribados neonatales. La EF posee todas las características necesarias para ser incluida en dichos programas de cribado. Es una enfermedad grave,

frecuente y que, de no ser detectada en fases precoces, lo que ocurre de forma habitual debido a sus síntomas poco específicos, produce graves morbilidades, así como una reducción de la esperanza de vida. La existencia de un tratamiento eficaz, sobre todo iniciado en fases tempranas favorece aún más su inclusión dentro de los programas de cribado neonatal.

Para la realización del cribado de la EF, de forma inicial se cuantifica la actividad enzimática de α -GalA y en aquellos casos con baja actividad enzimática se lleva a cabo el estudio genético permitiendo identificar variante genéticas en el gen *GLA* causantes de EF. Estudios recientes (97) postulan la alta tasa de falsos negativos existentes entre las mujeres al utilizar como método de cribado inicial la actividad enzimática ya que hasta un 83% de las mujeres portadoras de variante patogénica del gen *GLA* presentan actividades enzimáticas por encima del punto de corte considerado como patológico necesario para continuar el estudio y realizar el estudio genético. Es por ello que se están comenzado a realizar los primeros estudios pilotos en los que se realiza directamente como método de cribado inicial en las mujeres el estudio genético del gen *GLA* sin necesidad de presentar una actividad enzimática baja (97).

El primer cribado neonatal de la EF se realizó a finales de la década 90 en Países Bajos y Australia. Desde entonces varios estudios piloto se pusieron en marcha en otros países, cuyos resultados figuran en la Tabla 9. En estos cribados se objetivó una incidencia de la EF mayor que la que inicialmente se sospechaba. Esto se debe a la elevada frecuencia de detección de fenotipos de inicio tardío.

La EF fue incorporada por primera vez en un panel de cribado neonatal en Missouri en el año 2013 (141).

Tabla 9. Cribados neonatales realizados en el mundo. Modificada de *Navarrete-Martínez y colaboradores (142)*.

Localización, año del estudio	Individuos testados	Incidencia
Países Bajos, 1999		1 en 238 100 (varones)
Australia, 1999		1 en 117 000
UK, 2001		1 en 366 000 (varones)
Italia, 2006	37 104	1 en 3 100
Taiwan, 2009	171 977	1 en 1 250 (varones) 1 en 40 840 (mujeres) 1 en 22 570 (forma clásica)
Taiwan, 2009	110 027	1 en 1 368
Japón, 2009	21 170	1 en 7 057
Hungría, 2012	40 024	1 en 13 341
Austria, 2012	34 736	1 en 3 859
Washington, 2013	110 000	1 en 7 800 (varones)
Taiwan, 2014	191 767	1 en 2 997
Missouri, 2015	43 701	1 en 2 913
Washington, 2016	43 000	1 en 10 000 (varones)
Illinois, 2017	219 973	1 en 8 454
México, 2017	20 018	1 en 2 048
New York, 2018	65 605	1 en 9372
Norte de Italia, 2018	44 411	1 en 8882

La puesta en marcha de los cribados neonatales ha traído consigo el hallazgo de un sinnúmero de variantes del gen *GLA*. Algunas son mutaciones consideradas claramente patogénicas (ocasionan EF clásica o de inicio tardío) y un gran número de ellas son mutaciones de significado incierto en las que no se ha podido establecer una clara relación causal con el fenotipo del paciente y por tanto establecer una relación genotipo-fenotipo.

La identificación de las variantes patogénicas (EF Clásica o de inicio tardío) de forma precoz permitiría el inicio del tratamiento de forma temprana. Aun así, el diagnóstico precoz de las formas tardías de la enfermedad de Fabry mediante programas de cribado neonatal, plantea varias preocupaciones éticas, como el aumento de la ansiedad de los padres, la privación de autonomía del niño, el incremento de las intervenciones terapéuticas y la realización de múltiples procedimientos diagnósticos que propician un aumento de la ansiedad anticipatoria (141). En un estudio realizado por Lisi y colaboradores en Austria y publicado en 2016 (141) sobre la opinión, en pacientes diagnosticados de EF y otras enfermedades lisosomales (Enfermedad de Pompe de inicio tardío y enfermedad de Gaucher) sobre los programas de cribado neonatal se objetivó una gran aprobación (78.8%)

para la realización de dichos cribados en periodo neonatal incluso teniendo en cuenta que el inicio de la sintomatología sea tardío y al realizar el diagnóstico tan precoz ocasionemos ansiedad parental o pérdida de autonomía de los niños y su medicalización. Los pacientes manifiestan que el diagnóstico precoz habría evitado retrasos en el diagnóstico (en este estudio, más del 50 % de los pacientes con EF esperaron más de 5 años para ser diagnosticados desde el inicio de los síntomas) y les habría hecho tomar diferentes decisiones en su vida. En concreto en los pacientes afectados de EF, se objetivó como la mayoría (57%) considera que su estado de salud actual habría sido mejor si hubiesen sido diagnosticados en periodo neonatal, el 42% estaría más satisfecho con su vida actual y ningún paciente manifestó que su vida sería peor en el momento actual de haber sido diagnosticado mediante un programa de cribado neonatal.

La elevada frecuencia de detección de variantes de significado incierto debe ser un factor a la hora de decidir la incorporación de la EF en el panel del cribado neonatal, evaluando las ventajas y desventajas. Macklin y colaboradores (143) evaluaron el impacto psicosocial del diagnóstico de la condición de portador de una variante de patogenia dudosa [c.427G>A; p.(Ala143Thr)]. La mitad de los encuestados se sentía frustrado por la falta de información clara, pero a pesar la ambigüedad, dadas las consecuencias clínicas, creían que el conocimiento de dicho estado de portador les ayudaría en la práctica clínica. De esta forma, una mejor aproximación diagnóstica de estas variantes es crucial. La importancia de establecer una correlación genotipo-fenotipo se traduciría en una correcta información y clasificación de estos pacientes portadores de variantes de significado incierto y una inclusión precoz en los protocolos de tratamiento de ser considerada la variante encontrada como patogénica. Debido a estas dificultades para establecer una adecuada correlación de genotipo-fenotipo, la incorporación de la EF en los paneles de cribado neonatal genera mucha controversia.

Para poder establecer una correcta relación genotipo-fenotipo es de vital importancia el desarrollo de nuevos métodos diagnósticos que puedan clasificar estas variantes de significado incierto como patogénicas o no en base a su implicación a nivel molecular así como

conocer la evolución clínica de los pacientes portadores de estas variantes y la de sus familiares afectos.

1.2.2 Cribado en otras poblaciones

Doheny y colaboradores (144) llevaron a cabo una búsqueda de los cribados realizados desde 1995 hasta 2017 en varias poblaciones de riesgo (Hemodiálisis, trasplantados renales, patología cardiaca MCPH/Hipertrofia ventrículo izquierdo y ACV).

En la Tabla 10 y Tabla 11 se resumen los datos combinados de todos los estudios realizados en varones y mujeres respectivamente. En las poblaciones en hemodiálisis 1/490 varones y 1/670 mujeres son portadores de mutaciones patogénicas del gen *GLA*. En pacientes con MCPH/hipertrofia de ventrículo izquierdo 1/106 hombres y 1/111 mujeres han sido diagnosticados de EF y en los estudios realizados en pacientes que han presentado ACV en 1/780 varones y 1/690 mujeres se han detectado variantes patogénicas del gen *GLA*. Es de destacar que la mayoría de los pacientes diagnosticados de EF en contexto clínico de hemodiálisis y ACV son portadores de variantes del gen *GLA* de forma clásica, por lo que dichos pacientes han de presentar otras manifestaciones clínicas sugestivas de EF desde edades tempranas no habiendo sido diagnosticados previamente lo que pone manifiesto la falta de un diagnóstico precoz incluso en las formas clásicas de EF.

Tabla 10. Resumen Cribados EF Mujeres 1995-2017. Modificado de *Doheny y colaboradores* (144).

Estudio clínico	Estudios (n)	Mujeres (n)	Positivos Totales n(%)	Revisados por fenotipo				Benignas	
				Patogénicas				Benignas n(%)	% de variantes
				Total n(%)	Clásico n(%)	Inicio Tardío n(%)	Tipo1: Tipo2 ratio		
Hemodiálisis									
	20	12866	87 (0.68)	19 (0.15)	13 (0.10)	6 (0.05)	2:1	68 (0.53)	78.3
Trasplante Renal									
	2	1043	3 (0.29)	0 (0.00)	-	-	-	3 (0.29)	100.0
Patología Cardíaca (MCPH)									
	12	1437	22 (1.53)	13 (0.9)	8 (0.56)	5 (0.35)	2:1	9 (0.63)	49.9
ACV									
	14	2074	23 (1.11)	3 (0.14)	3 (0.14)	0 (0.00)	1:0	20 (0.96)	87.0

Tabla 11. Resumen Cribados EF Varones 1995-2017. Modificado de *Doheny y colaboradores* (144).

Estudio clínico	Estudios (n)	Hombres (n)	Positivos Totales n(%)	Revisados por fenotipo				Benignas	
				Patogénicas				Benignas n(%)	% de variantes
				Total n(%)	Clásico n(%)	Inicio Tardío n(%)	Tipo1: Tipo2 ratio		
Hemodiálisis									
	27	23954	101(0.42)	50 (0.21)	33 (0.14)	17 (0.07)	2:1	51 (0.21)	50.5
Trasplante Renal									
	3	2031	11 (0.54)	5 (0.25)	3 (0.15)	2 (0.10)	3:2	6 (0.30)	54.5
Patología Cardíaca (MCPH)									
	16	4054	49 (1.21)	38 (0.94)	9 (0.22)	29 (0.72)	1:3	11 (0.27)	22.5
ACV									
	16	3904	26 (0.67)	5 (0.13)	3 (0.08)	2 (0.05)	3:2	21 (0.54)	80.8

1.2.2.1 Cribado en Población con Enfermedad Renal Crónica

Se han llevado a cabo múltiples estudios de cribado en pacientes con insuficiencia renal crónica (IRC) como se detalla en la Tabla 12 (145). Según la población incluida en el cribado, IRC/Pacientes dializados/trasplantados renales.... Las prevalencias varían entre 0-1 siendo una estimación media de la prevalencia 0.2-0.3 %.

Debido a la gran cantidad de pacientes con enfermedad renal crónica portadores de GVUS detectados en dichos estudios de cribado realizados en poblaciones con afectación en la función renal de forma severa sin diagnóstico etiológico, Van der Tol y colaboradores recomiendan realizar una biopsia renal en aquellos individuos afectados de una enfermedad renal crónica que sean portadores de una variante del gen *GLA* de significado incierto con el objeto de confirmar o rechazar el diagnóstico de EF y de este modo iniciar o no TES además de la implicación que ello conlleva en la realización de cribado de otros familiares (146).

Tabla 12. Cribados en Población con IRC. (DBS= Dried Blood Spot; WBC=White blood cell). Modificado de *Trachoo y colaboradores* (145).

País	Género	Tipo de muestra	Prevalencia	Referencia
Japón	M y F	Plasma	0,28	Utsumi et al., 2000
Japón	M	Plasma, WBC, genética	1,17	Nakao et al., 2003
Holanda	M	Plasma	0,20	Linthorst et al., 2003
Austria	M y F	DBS, WBC, genética	0,16	Kotanko et al., 2004
Francia	M y F	WBC, genética	0,94	Bekri et al., 2005
Japón	M	Plasma, genética	0,22	Ichinose et al., 2005
Japón	M y F	Plasma, WBC, genética	0,72	Tanaka et al., 2005
Rep. Checa	M y F	DBS, WBC	0,15	Merta et al., 2007
Lituania	M	DBS	0	Maslauskiene et al., 2007
Canadá	M	Plasma, WBC	0	Andrade et al., 2008
Brasil	M	DBS, plasma	0,36	Porsch et al., 2008
Holanda	M y F	Plasma, genética	0,33	Terryn et al., 2008
España	M y F	DBS, genética	0,55	Gaspar et al., 2010
UK	M	DBS, plasma, WBC	0	Wallin et al., 2011
Japón	M y F	DBS, genética	0,32	Nishimo et al., 2012
Japón	M	Suero, genética	0,19	Doi et al., 2012
Turquía	M	Plasma, genética	0,25	Kalkan Ucar et al., 2012
Japón	M	Plasma, genética	0,21	Maruyama et al., 2013
Turquía	M y F	DBS, genética	0,18	Okur et al., 2013
Líbano	M	DBS, genética	0	Kabalan et al., 2013
España	M y F	Plasma, genética	0,30	Herrera and Miranda et al., 2014
Tailandia	M y F	DBS, genética	0	Trachoo et al., 2017
Módena	M y F	DBS, plasma, genética	0	Alfano et al., 2018
Taiwan	M	DBS y genética	0,59	Lin et al., 2018

1.2.2.2 Cribado en Población con MCPH

No son muchos los estudios de cribado realizados entre pacientes con MCPH de etiología desconocida (ver Tabla 13). Se han objetivado prevalencias entre 0.5-6 % de pacientes con EF (42,43,147-151) con prevalencia media estimada 0.5-1%.

En dichos estudios se han encontrado una gran cantidad de pacientes portadores de GVUS en el gen *GLA* por lo que se ha realizado un consenso sobre la actitud diagnóstica y con ello terapéutica en estos

pacientes. Aquellos pacientes adultos que presentan una hipertrofia ventricular izquierda (adelgazamiento máximo de la pared en diástole > 12 mm) y son portadores de GVUS en gen *GLA* si además NO presentaban voltajes bajos en el ECG (< 1.5 mV) y la severidad de la hipertrofia en edades tempranas NO es severa (adelgazamiento máximo de la pared en diástole 12-15 mm en menores de 20 años) se debe sospechar EF y por tanto se debe considerar realizar una biopsia endomiocárdica para confirmar un diagnóstico definitivo. No se debe considerar la EF como causa etiológica de la presencia de hipertrofia ventricular izquierda y por tanto no se debe realizar cribado de EF en aquellos pacientes que además de presentar hipertrofia ventricular izquierda tengan voltajes bajos en el ECG y la hipertrofia sea severa en edades tempranas (152).

Recientemente se ha publicado un estudio de cribado en pacientes con MCPH (153) en el que se realizó una estimación del coste de dicho cribado utilizando el estudio enzimático de forma inicial independientemente del sexo y realizando la secuenciación del gen *GLA* en aquellos sujetos en los que la actividad enzimática se encuentre reducida. La prevalencia obtenida (0.42 %) concuerda con la descrita en otros estudios similares (ver Tabla 13) y el coste estimado para la detección de 1 paciente con EF es de 24000 dólares, menor que lo que los 60000 dólares estimados que supondría un estudio de cribado en el que se realizase la determinación de actividad enzimática a los varones y la secuenciación del gen *GLA* a todas las mujeres y a aquellos varones con actividades enzimáticas bajas. Concluyen que la realización de un programa de cribado de EF en pacientes con MCPH determinando la actividad enzimática supone un menor coste por diagnóstico.

Tabla 13. Resumen de Cribados Destacados en Población con MCPH (42,43,147-151)

Localización, año	Pacientes estudiados	Pacientes con variantes <i>GLA</i>	Prevalencia
Japón, 1995	230	7	3%
Reino Unido, 2002	79	5	6.3%
España, 2007	508	5	1%
Francia, 2011	392	4	1%
Europa, 2011	1386	7	0.5%
Japón, 2016	177 (Varones)	2	1.1%
EEUU, 2018	585	2	0.34%

1.2.2.3 Cribado en Población con ACV

Se han realizado múltiples estudios de cribado de EF entre población joven con ACV (AIT, Infarto isquémico) con prevalencias en la mayoría de ellos menores al 1% (154). Existen algunos estudios con prevalencias mayores, por ejemplo, en el estudio realizado por Rolfs y colaboradores en 2006 se detectan prevalencias 4.9% en varones y 2.4% en mujeres (61) pero no especifica el tipo de variantes incluidas como patogénicas. En el estudio realizado en Portugal por Baptista y colaboradores (155) se describen prevalencias de 2.4 % y se incluyen como variantes patogénicas del gen *GLA* determinados genotipos clasificados en la actualidad como GVUS. Sólo existe un estudio realizado en Latinoamérica (Argentina) objetivando prevalencias de EF en pacientes jóvenes que habían sufrido AIT, infartos isquémicos o hemorrágicos de 0.3 % (156). En 2018 Lee y colaboradores revisaron los estudios de cribado de EF realizados hasta la fecha en pacientes jóvenes con infartos según hayan sido realizados en población asiática o no encontrando frecuencias similares en ambas poblaciones (0.62-0.88 % respectivamente) aunque destacan el menor número de diagnósticos de EF en mujeres asiáticas (0.58 %) (157). Debido a todos los estudios de cribado realizados se recomienda considerar el diagnóstico de EF en pacientes jóvenes que han presentado infartos criptogenéticos, sobre todo en aquellos con infartos recurrentes (158).

1.2.2.4 Cribados en otras poblaciones

Existe un estudio de cribado de EF realizado en población con dolor neuropático de fibra pequeña de etiología desconocida. Dicha sintomatología está presente en una gran cantidad de los pacientes con EF (80%) y ocasiona un alto impacto clínico. En dicho estudio se

demonstró que un 20 % de dichos pacientes eran portadores de mutaciones del gen *GLA* y sugieren la inclusión de dicho cribado en los pacientes con dolor neuropático sin diagnóstico etiológico reconocido para realizar un diagnóstico y tratamiento adecuado y precoz para evitar la progresión clínica en otros órganos (159).

En cuanto la posibilidad de realizar cribado en poblaciones pediátricas fuera del periodo neonatal, en Rusia se ha llevado a cabo un programa federal de cribado en niños de entre 2 y 18 con dolores crónicos de extremidades de características neuropáticas (acroparestesias). En dicho estudio, que incluía 214 pacientes, no se detectó ningún paciente con EF. Todos presentaban funciones enzimáticas del α -galactosidasa dentro de la normalidad y las variantes genéticas encontradas en el gen *GLA* no están consideradas como patogénicas. Concluyen que la presencia de dolor neuropático en esta población no parece ser altamente predictivo de EF en probable relación a la baja especificidad de dicho síntoma (160).

1.3 VARIANTES DE SIGNIFICADO INCIERTO

Desde el inicio de la terapia enzimática sustitutiva se han comenzado a realizar múltiples estudios de cribado en poblaciones de riesgo o en recién nacidos como se ha comentado previamente. Debido a este gran número de estudios realizados se han detectado una gran cantidad de individuos portadores de variantes genéticas del gen *GLA* de patogenicidad dudosa, es decir, no se puede asegurar con una cierta fiabilidad si las manifestaciones clínicas que presenta, en el caso de los cribados en población de riesgo, son debidas a esa variante del gen *GLA* y por tanto es un paciente afecto de EF y debe considerarse la TES o dichas manifestaciones clínicas son debidas a otra etiología que nada tiene que ver con la EF. En el caso de los cribados en recién nacidos el problema se acrecienta ya que en el momento en que se diagnostica a un paciente de portar una determinada variante del gen *GLA* y durante varios años el sujeto no va a presentar ningún tipo de manifestación clínica tenga o no la EF.

Para establecer la patogenicidad de una variante genética es importante tener en cuenta la actividad enzimática en los varones (no es útil en las mujeres debido al efecto Lyon comentado previamente),

las manifestaciones clínicas y el acúmulo de LysoGb3. Una ausencia de actividad enzimática, una sintomatología clínica sugestiva de EF con afectación de varios órganos (riñón, corazón, SNC), afectación ocular (córnea verticilata) y dermatológica (angioqueratoma) así como unos niveles elevados de LysoGb3 orientan a una patogenicidad de la variante del gen *GLA* que el sujeto presenta. Pero si solo nos encontramos con afectación en un único órgano, la actividad enzimática está reducida pero no ausente, y los niveles de LysoGb3 no son elevados las dudas sobre la patogenia de esa variante son elevadas. Si, además, como hemos reseñado anteriormente, el cribado se realiza en recién nacidos en los que ni las manifestaciones clínicas ni los niveles de LysoGb3 ayudarán a la correcta clasificación de la variante ya que ambos pueden ser normales aun siendo enfermo, es preciso poder realizar otro tipo de estudios para clasificar de manera más precisa la variante genética encontrada.

Todas las variantes del gen *GLA* que no se clasifican en patogénicas o benignas se tipifican como Variantes de Significado Incierto, GVUS por sus siglas en inglés (Genetic Variants of Unknown Significance).

En 2014 Van der Tol y colaboradores realizaron un estudio sobre la prevalencia de GVUS en los programas de cribado realizados hasta la fecha (161). En relación a los cribados neonatales globalmente encuentran prevalencias 0.04% (1/2500) de sujetos portadores de variantes del gen *GLA*. El 90 % de dichas variantes son GVUS. En la población europea las variantes más frecuentemente encontradas son c.427G>A;p(Ala143Thr), p.R112H y c.937G>T;p(Asp313Tyr) (161). La variante IVS4+919G>A constituía el 83 % del total de variantes detectadas en el programa de cribado neonatal realizado en Taiwan en el año 2009 (162). En los cribados realizados en poblaciones de riesgo (IRT, MCPH, ACV...) describen prevalencias globales de pacientes portadores de variantes del gen *GLA* de 0.62% (1/160) considerando prevalencias GVUS 1/335 y variantes productoras de fenotipo clásico 1/850 y. Las variantes del gen *GLA* más frecuentemente encontradas son c.937G>T;p(Asp313Tyr), p.E66Q y c.427G>A;p(Ala143Thr). Proponen que para considerar que una variante del gen *GLA* es causante de EF precisa de, además de en los varones una ausencia o severa disminución (< 5% del valor de referencia) de la actividad enzimática

α -GalA, un mínimo de 1 criterio de los siguientes: acroparestesias, córnea verticilata, angioqueratoma, aumento LysoGb3 o Gb3 en plasma o un familiar afecto según los estos criterios descritos. Schiffmann y colaboradores (96) argumentan que se puede establecer el diagnóstico de EF en aquellos sujetos varones portadores de GVUS con actividad enzimática de α -GalA < 25%. Pero si la actividad enzimática se sitúa entre 25-40 % en varones y en las mujeres independientemente de la actividad enzimática portadores de GVUS, entonces se debe determinar Gb3 en muestra de tejido.

De las controversias existentes en algunas variantes definidas como polimorfismo por existir en más del 1% de la población se puede deducir que existen otros factores epigenéticos que implican que determinados individuos desarrollen un fenotipo compatible con EF y otros no. Un claro efecto de como por mecanismos epigenéticos se puede regular la expresión génica lo constituye la distrofia fascioscápulohumeral. Está causada por la expresión del gen DUX4 el cual tiene un efecto nocivo para el músculo. Dicho gen es codificado en la región D4Z4 hipermetilada en condiciones normales y por tanto no expresada. Si se produce una hipometilación de dicha zona, bien por acortamiento en la región D4Z4 o por mutación en el gen SMCHD1 (18p11.32) que codifica una proteína implicada en la metilación de la región D4Z4 entonces se expresa el gen DUX4. Si dicha situación, de baja prevalencia, ocurre en sujetos portadores del haplotipo 4qA161 el cual estabiliza los transcritos del gen DUX4 y que tiene elevada prevalencia se produce la enfermedad. Así pues el ser portador del haplotipo 4qA161 implica, en aquellos individuos predispuestos, el manifestar la enfermedad (163–165). De igual modo se puede explicar como un mecanismo epigenético desconocido en el momento actual puede disminuir la expresión del gen *GLA* en sujetos predispuestos portadores de determinados haplotipos prevalentes.

1.3.1 Variantes en Secuencias Intrónicas

Las dudas sobre la patogenidad de una variante son aún mayores si se encuentran en regiones no codificantes del gen.

Sin embargo, para una correcta funcionalidad de la proteína es necesario un correcto *splicing* y podemos afirmar que determinadas

alteraciones en las secuencias intrónicas pueden afectar a dicho *splicing* del Ácido Ribonucleico (RNA). La eficiencia del *splicing* del preRNAm depende, como ya se dijo, de una secuencia intrónica correcta y puede modificarse mediante secuencias potenciadoras y supresoras. Dichas secuencias no se han conseguido caracterizar completamente en el momento actual por lo que no se puede predecir de inmediato si una variante intrónica afecta o no el *splicing* sin utilizar predictores *in silico* y confirmar experimentalmente (166).

Se ha demostrado que un *splicing* aberrante es la causa de al menos el 15% de las enfermedades genéticas humanas (167). Las primeras mutaciones intrónicas que producen afectación en el *splicing* y ser de esta forma causante de enfermedades fueron descritas en la década de los 80 y principios de los años 90 (168).

La primera mutación que produce alteración en el *splicing* en la EF fue descrita por Sakuraba y colaboradores en 1992 (168). Dicha mutación localizada en el intrón 7 produce la eliminación del exón 6 y consecuentemente la reducción en RNA y la pérdida de 66 aminoácidos lo que se traduce en una afectación clínica compatible con la forma clásica de EF. En 1998 Matsumura y colaboradores (169) demostraron como la variante intrónica IVS6-1G>A destruía el sitio auténtico de *splicing* creando uno nuevo en otra posición provocando una deleción en el exón 7 del Ácido Ribonucleico Mensajero (mRNA). Germain y Poenaru (170) también describieron como la variante IVS3 G(-1)→C alteraba el *splicing* del RNA con la alteración en el marco del lectura y aparición de un codón de terminación prematuro. 10 años más tarde de las publicaciones de Sakuraba, Lai y colaboradores (171) analizaron ya 20 variantes del gen *GLA* que producen afectación en el *splicing* (algunas de localización en regiones intrónicas y otras localizadas en exones) todas ellas productoras de fenotipo clásico. Duro y colaboradores (172) describieron el 4,9% de variantes relacionadas con afectación en el *splicing* de un total de 207 sujetos con fenotipo de EF y portadores de alguna variante del gen *GLA*. Las variantes descritas (IVS2-2>G, IVS3+1G>A, IVS4+5G>T y IVS5+1G>T) fueron objetivadas en sujetos con fenotipo clásico, disminución importante de la actividad enzimática y acúmulo de LysoGb3. También se han descrito variantes intrónicas con afectación en el *splicing* causante de

EF de inicio tardío con afectación clínica cardíaca (166,173) como la variante g.9331G>A (c.639+919G>A)/IVS4+919G>A localizada en una posición media del intrón 4, que debido a dicha modificación en el *splicing* produce un aumento del reconocimiento y se inserta una secuencia intrónica en el RNA transcrito provocando afectación de la composición y la función de la enzima α -galactosidasa (109,174). Watanabe y colaboradores (175) en 2012 describieron como la variante IVS5-1G>T localizada en el intrón 5 del gen *GLA* causaba un nuevo lugar *splicing* y una delección de 4 bases en el exón 6 del mRNA que se traducía en un cambio en el marco de lectura provocando una terminación prematura (y por tanto un proteína más corta y probablemente no funcional). Dicha variante no solamente fue hallada en leucocitos en sangre periférica sino también en muestra de biopsia endomiocárdica en un paciente varón con fenotipo EF - variante cardíaca (MCHP), disminución actividad enzimática α -GalA y estudio anatomopatológico en biopsia cardíaca compatible con EF. Higuchi y colaboradores describieron un sujeto con fenotipo clásico de EF portador de una mutación en el intrón 3 que produce una inserción de 115 bp en el cDNA produciendo un codón de parada prematuro en el RNA (176). En la Tabla 14. se detallan la mayor parte de las variantes intrónicas relacionadas con el *splicing* causantes de EF publicadas hasta la fecha.

Tabla 14. Variantes Intrónicas Patogénicas con afectación en el *splicing*.

Variante	Intrón	Fenotipo	Referencia
IVS1-1G>T	1	Clásico	Okumiya et al, 1996 (177)
IVS2+2	2	Clásico	Eng et al, 1993 (178)
IVS2+1G>A	2	Clásico	Ashton-Prolla et al, 2000 (179)
IVS3+1G>A	3	Clásico	Ashton-Prolla et al, 2000 (179)
IVS3-1G>A	3	Clásico	Yokoi et al, 1991 (180)
IVS3 G(-1)>C	3	No especificado	Germain et al, 1999 (170)
IVS3-1G>T	3	Clásico	Davies et al, 1994 (181)
c.547+395G>C	3	Clásico	Higuchi et al, 2016 (176)
IVS4+1G>C	4	Clásico	Ashton-Prolla et al, 2000 (179)
c.639+329_c.639+330ins113	4	Clásico	Higuchi et al, 2016 (176)
IVS4+1G>A	4	Clásico	Rodríguez-Mari et al, 2003 (182)
IVS4+2T>C	4	Clásico	Eng et al, 1997 (183)
IVS4 +4A>T	4	Clásico	Topaloglu et al, 1999 (25)
g.9273C>T	4	Clásico	Filoni et al, 2008 (184)
c.640-1G>C	4	Clásico	Cabrera et al, 2018 (185)
IVS4919G>A	4	Cardiaco	Ishii et al, 2002 (174)
IVS5-1G>T	5	Cardiaco	Watanabe et al, 2013 (175)
IVS5+2T>C	5	Clásico	Blaydon et al, 2001 (186)
IVS5-Δ2,3	5	Clásico	Eng et al, 1993 (178)
IVS6-1G>A	6	Clásico	Matsumura et al, 1998 (169)
IVS6+1G>T	6	Clásico	Sakuraba et al, 1992 (168)
No especificada	6	Clásico	Shabbeer et al, 2005 (187)
IVS6 +2T>C	6	Clásico	Topaloglu et al, 1999 (25)
IVS6 -1T>C	6	Clásico	Topaloglu et al, 1999 (25)

Otras variantes intrónicas sin relación directa con el *splicing* han sido descritas en relación a la EF. Oliveira y colaboradores (188) demostraron el efecto sobre la actividad enzimática de α -Galactosidasa de 3 polimorfismos en la región no transcrita del exón 1 (región promotora) que ni modifican la secuencia normal del péptido α -Galactosidasa ni modulan el inicio de la transcripción. De los tres polimorfismos estudiados sólo uno (g.5051C>T/c.-10C>T/rs2071225/g.1170C>T) produce disminución significativa en la actividad enzimática. El mismo grupo describió una familia portadora de esta variante que presenta enfermedad isquémica cerebrovascular de pequeño vaso (189) e hipotetizó sobre la posibilidad de que dicha variante ejerciese un papel en la atenuación de la transcripción y contribuyese al riesgo multifactorial de presentar enfermedad isquémica cerebrovascular de pequeño vaso.

Duro y colaboradores (172) han objetivado mutaciones en regiones no codificantes del gen *GLA* localizadas fuera del lugar del *splicing* agrupadas en haplotipos cuya prevalencia es el doble en sujetos con sintomatología compatible con EF respecto a sujetos sanos. Todos ellos presentan actividad enzimática normal y valores de LysoGb3 también dentro del rango de la normalidad.

Cabrera y Perretta (185) han descrito recientemente a dos hermanos varones con sintomatología compatible con fenotipo clásico de EF, disminución de la actividad enzimática α -GalA y portadores de variante intrónica del gen *GLA* c.640-1G>C. Recomiendan estudiar las regiones no codificantes del gen *GLA* en pacientes con fenotipo sugestivo de EF en los que no se encuentren alteraciones en las secuencias codificantes que son las estudiadas de forma rutinaria. Recomendaciones similares realizan Pisani y Colaboradores al describir un mujer con fenotipo clásico de EF portadora de haplotipo intrónico complejo en el gen *GLA* y no detectar otra alteración genética en gen *GLA* (167). De esta forma se podría confirmar el diagnóstico de EF en pacientes con sintomatología compatible con EF y estudio genético *GLA* (rutinario, sin incluir regiones intrónicas) normal.

Sin embargo, contrariamente a todo lo descrito previamente, en un estudio realizado en 2012 (190) investigando la relevancia clínica de varios haplotipos del gen *GLA* que contienen una combinación de varias variantes en secuencias intrónicas concluyen que su hallazgo debe considerarse incidental y no relevante para el diagnóstico de EF. En dicho estudio se analizaron 67 mujeres con sintomatología compatible con EF objetivando variantes en secuencias intrónicas en 12 de ellas, agrupados en haplotipos compuestos.



2

Hipótesis y Objetivos



2 Hipótesis y Objetivos

2.1 HIPÓTESIS

La detección precoz a través de la realización de un cribado neonatal de los sujetos portadores de variantes del gen *GLA* productoras de fenotipo clásico o tardío de la EF permitiría el inicio temprano de la terapia sustitutiva mejorando el pronóstico a largo plazo.

La presencia de polimorfismos validados/mutaciones en secuencias no codificantes (englobadas en GVUS) en el gen *GLA* puede contribuir a la alteración de la expresión de la α -GalA por mecanismos de regulación epigenéticos anómalos o en asociación a defectos en genes relacionados (ej. factores de transcripción), generando un fenotipo clínicamente parecido al de la EF.

2.2 OBJETIVOS

2.2.1 Objetivo Principal

Se pretende realizar el diagnóstico de EF en poblaciones en fases precoces y asintomáticas mediante la elaboración de un Programa de Cribado Neonatal. De este modo podríamos, por un lado, estimar la dimensión real de la prevalencia de la EF en la población española y, por otro lado, realizar el diagnóstico en estas fases tempranas, iniciando el tratamiento de forma precoz.

En aquellos sujetos que presentan estudios genéticos de interpretación dudosa en la fase de cribado se pretende conocer más exhaustivamente el mecanismo molecular de la EF mediante el análisis de la transcripción del gen *GLA*, cuantificación de la cantidad de proteína, detección de los depósitos mediante la determinación de LysoGb3 y estudio del patrón de metilación. Esto permitiría establecer una aproximación diagnóstica más precisa en ausencia de manifestaciones clínicas.

2.2.2 Objetivos Secundarios

Realizar una valoración y seguimiento clínico de los sujetos portadores de GVUS con el fin de detectar, en edades tempranas, manifestaciones clínicas compatibles con EF lo que implicaría el inicio de tratamiento de forma precoz con los beneficios en relación a la morbilidad y mortalidad reconocidos.

Realizar una evaluación médica de los familiares en línea ascendente de primer y segundo grado que presenten el mismo defecto genético de los sujetos portadores de GVUS a estudio para evaluar la expresividad clínica a distintas edades.





3

Justificación del estudio

CRISTINA MELCÓN CRESPO



3 Justificación del estudio

3.1 RELEVANCIA CIENTÍFICA DE LA INVESTIGACIÓN

Al realizar una revisión bibliográfica en el buscador PUBMED utilizando como MESH "Fabry Disease" (búsqueda realizada en Marzo 2019) el número total de artículos es de 3244 (ver Figura 8). Es importante destacar como las publicaciones sobre la enfermedad de Fabry han crecido de manera exponencial en los últimos años según se puede objetivar en la Figura 8.

Este aumento, llamativo desde el comienzo del siglo XXI, ha sido en gran parte debido al inicio de tratamiento con TES a partir del año 2001, generando numerosas publicaciones tanto en relación a la eficacia clínica del mismo como los estudios de cribados neonatales o en poblaciones de riesgo realizados. Van der Tol y colaboradores describieron en 2014 que el 45% de los estudios de cribados realizados hasta entonces había sido financiados por empresas productoras de terapia enzimática suplementaria (161).

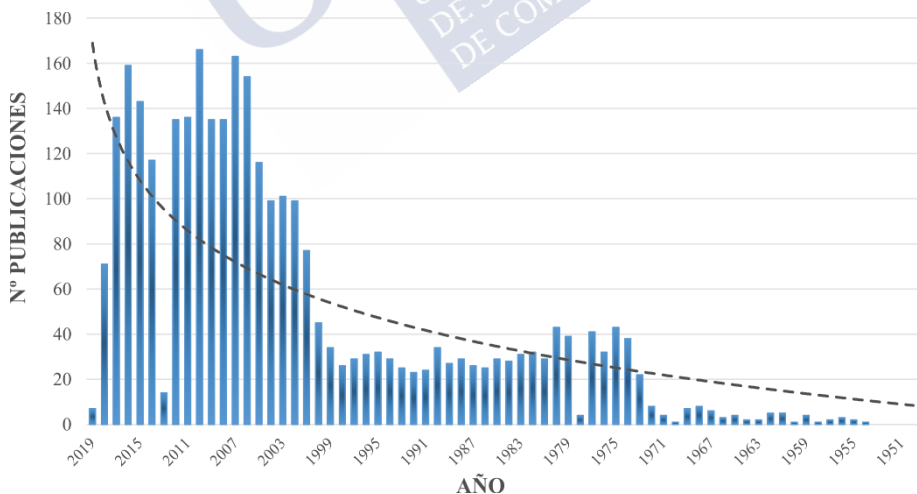


Figura 8 Publicaciones científicas sobre enfermedad de Fabry. (Imagen de elaboración propia)

En relación a los cribados neonatales, tal y como se ha descrito previamente (ver 1.2.1 Cribado Neonatal), se han realizado 17 desde que se iniciaron en la década de los 90 si bien ninguno, salvo el presentado, ha sido llevado a cabo en España.

Si reducimos nuestra búsqueda bibliográfica a aquellos artículos focalizados en el diagnóstico, el número es aún más escaso (1127). Y si seleccionamos las publicaciones que investigan la parte genética de la EF el número de artículos disminuye hasta 1081.

Los estudios centrados sobre el diagnóstico en casos dudosos (baja actividad de α -GalA con alteraciones genéticas en *GLA* identificables como polimorfismos o mutaciones en las secuencias no codificantes) son escasos y no concluyentes.

Aunque estas variantes no sean directamente relacionables con la EF, es posible que su presencia en asociación con alteraciones epigenéticas o defectos en genes relacionados (ej. factores de transcripciones que se unen al gen *GLA*) contribuya a la alteración de los niveles de expresión de *GLA*. Aclarar estos mecanismos, facilitaría el diagnóstico de los sujetos que presentan las condiciones descritas y en consecuencia su inclusión en protocolos terapéuticos adecuados.

Por otro lado, las dificultades a la hora de diagnosticar EF en fases iniciales se deben en parte al desconocimiento de los mecanismos moleculares implicados en su patogenia. Al estudiar el análisis de transcritos en pacientes con defectos genéticos validados hasta la fecha como no patológicos y que presenta afectación en la actividad enzimática nos ayudaría a entender los mecanismos fisiopatológicos de la enfermedad y a avanzar en la búsqueda de métodos diagnósticos fiables en fases precoces.

3.2 RELEVANCIA PRÁCTICA DE LA INVESTIGACIÓN

Debido al aumento de la capacidad tecnológica que favorece la expansión de los cribados neonatales y los avances en el campo de la genética, cada vez son más los estudios de cribado realizados detectando un mayor número de pacientes portadores de variantes de significado incierto del *GLA* en fases presintomáticas.

3. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

La realización de un diagnóstico definitivo y precoz de EF en dichos pacientes permitiría su inclusión en protocolos terapéuticos de forma precoz lo cual redundaría en beneficios tanto para el paciente (minimiza la aparición de secuelas, disminuye la morbilidad y aumentando tanto la calidad como la esperanza de vida) como para el Sistema Nacional de Salud al disminuir los gastos derivados de la afectación multisistémica por el retraso diagnóstico.

El estudio de los mecanismos de regulación del gen ayudaría en la investigación de nuevas dianas terapéuticas y biomarcadores fiables para la monitorización de las terapias.







4

Metodología



4 Metodología

4.1 DISEÑO DEL ESTUDIO

Se dividió el estudio en dos partes diferenciadas. En un primer paso se realizó el estudio descriptivo de prevalencia de la EF mediante el análisis de la actividad enzimática α -GalA en todos los recién nacidos durante en el año 2008 en Galicia y se amplió el estudio realizando secuenciación del gen *GLA* en aquellos sujetos con actividades enzimáticas por debajo del corte establecido. Posteriormente se llevó a cabo el estudio sobre el efecto de los polimorfismos /mutaciones en secuencias no codificantes en el gen *GLA* (GVUS) sobre la expresión de α -GalA en los sujetos diagnosticados a través del estudio previo mediante un estudio caso-control determinando LysoGb3, mRNA, cantidad de proteína y estudio de metilación.

4.2 POBLACIÓN DE REFERENCIA Y DE ESTUDIO

En el estudio descriptivo de prevalencia se estudiaron todos los pacientes nacidos en la Comunidad Autónoma de Galicia en el año 2008 en los que se había obtenido muestra de cribado neonatal. Sobre la base de los escasos datos de incidencia de la EF de forma clásica en recién nacidos (Ver Tabla 9), se calculó (software Ene3.0) que el tamaño muestral adecuado para detectar pacientes tendría que ser como mínimo de alrededor de 15000. Durante los años 2005, 2006 y 2007 nacieron respectivamente 21097/21392/21752 niños en Galicia, datos obtenidos del Instituto Nacional de Estadística (191), por lo que se esperaba, que durante el año 2008, en el que se realizó el estudio, el número de nacimientos fuese similar. En base a estudios previos se han detectados incidencias de EF de 1:7000 - 1:8000, por lo que esperamos encontrar en nuestro estudio 2-3 niños con EF.

Para el estudio de casos y controles hemos calculado (software Ene3.0) que un tamaño muestral de 12, que se corresponde con la totalidad de los casos que podemos reclutar (pacientes provenientes del estudio previo de cribado neonatal realizado en el año 2008 y pertenecientes al área sanitaria Pontevedra-Sur en los que se habían

encontrado actividades enzimáticas por debajo del corte establecido y eran portadores de polimorfismos/mutaciones en secuencias no codificantes en el gen *GLA*), nos permitiría ver variación de un 25% en las variables cuantitativas medidas con una potencia superior al 90%, asumiendo que las desviaciones estándar son de alrededor del 15% (valores encontrados habitualmente en medición de transcritos por q-PCR). Si en el estudio se incluyen 12 unidades experimentales en el grupo Control (pacientes nacidos en el año 2008 en la misma área sanitaria sin alteración en actividad enzimática de α -GalA ni en la secuenciación gen *GLA*) y 12 unidades en el grupo Caso (anteriormente descrito), se podrá conseguir una potencia del 99,99% para detectar diferencias en el contraste de la hipótesis nula $H_0: \mu_1 = \mu_2$ mediante una Prueba T-Student bilateral para dos muestras independientes, teniendo en cuenta que el nivel de significación es del 5,00%, y asumiendo que la media del grupo de Referencia es de 1,00 unidades, la media del grupo Experimental es de 0,75 unidades y la desviación típica de ambos grupos es de 0,10 unidades.

4.3 CRITERIOS DE SELECCIÓN

Para la realización del estudio de Cribado neonatal se tuvieron en cuenta los siguientes criterios de inclusión/exclusión:

- Criterios de inclusión: Pacientes nacidos en la Comunidad Autónoma de Galicia en 2008 en los que se haya obtenido muestra de cribado neonatal. Firma de consentimiento informado por parte de padre/madre o tutor legal si es necesario realizar secuenciación del gen *GLA*.

- Criterios de exclusión: Pacientes con diagnóstico de EF o que no cumplan los criterios previos. No obtener la firma del consentimiento informado por parte de padre/madre o tutor legal.

En el estudio caso-control se establecieron los siguientes criterios de selección de los sujetos:

A – Grupo Caso

- Criterios de inclusión: Pacientes nacidos en la Comunidad Autónoma de Galicia en 2008 pertenecientes al área de salud Pontevedra-Sur en los que se encuentra disminución de actividad α -GalA (varones que presentan una actividad inferior a 1.5 μ moles/hL y

en mujeres con actividad inferior a 4.5 μ moles/hL) y en los que se hayan encontrado polimorfismos /mutaciones en secuencias no codificantes en el gen *GLA*. Firma de consentimiento informado por parte de padre/madre o tutor legal.

- Criterios de exclusión: Pacientes con diagnóstico de EF o que no cumplan los criterios previos. No obtener la firma del consentimiento informado por parte de padre/madre o tutor legal.

B- Grupo Control

- Criterios de inclusión: Pacientes SANOS nacidos en la Comunidad Autónoma de Galicia en 2008 pertenecientes al área de salud Pontevedra-Sur en los que NO se encuentre disminución de actividad α -GalA y en los que NO se hayan encontrado polimorfismos /mutaciones en secuencias no codificantes en el gen *GLA*. Firma de consentimiento informado por parte de padre/madre o tutor legal.

- Criterios de exclusión: No cumplir los criterios previos. No obtener la firma del consentimiento informado por parte de padre/madre o tutor legal.

4.3.1 Protocolo de estudio

En un primer momento, en el año 2008, mediante la muestra de sangre en papel de filtro obtenida para la realización del cribado neonatal sistemático que se realiza en Galicia y que se recoge entre el 3º y 5º día de vida, se estudió la actividad enzimática de α -GalA (se analizó tanto en varones como en mujeres para realizar una estimación de la prevalencia en varones/ población global y que serviría para detectar a las mujeres con EF que presenten actividad baja. Aun así, no podemos excluir la presencia de falsos negativos en mujeres). En aquellos sujetos en los que se objetivó una disminución de la actividad enzimática se realizó una segunda determinación. Si persistía una baja actividad enzimática se llevaba a cabo la secuenciación del gen *GLA* previa recogida de consentimiento informado. En aquellos sujetos en los que se detectó una variante patogénica o de significado incierto en el gen *GLA* se realizó el estudio genético en aquellos familiares de primer y segundo grado que lo autorizaron mediante la firma del consentimiento informado (ver Figura 9).

Se recogió la información sobre la edad gestacional y el peso al nacimiento que se recibe asociado a las muestras del cribado neonatal sistemático.

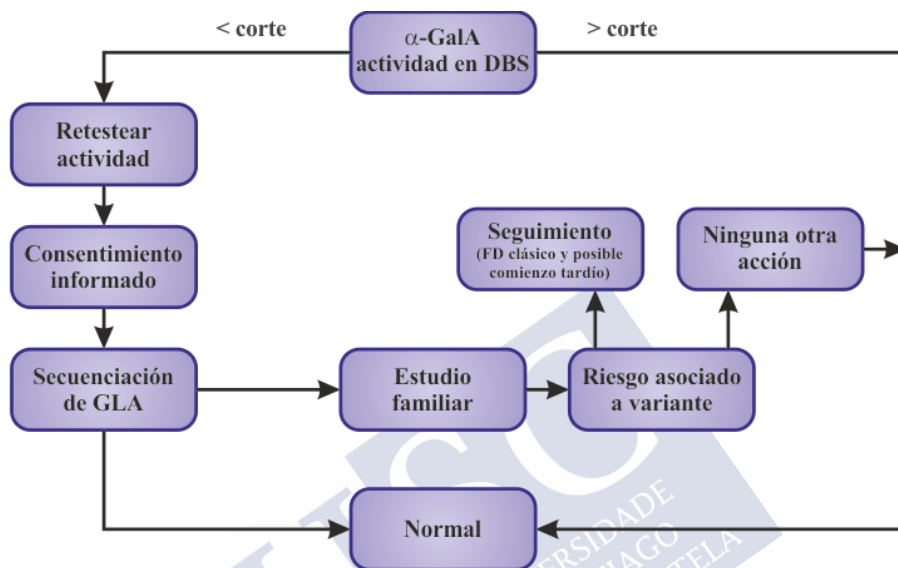


Figura 9 Protocolo de estudio del cribado neonatal. (Imagen de elaboración propia)

Posteriormente, se seleccionaron los sujetos pertenecientes al área sanitaria Pontevedra-Sur que presentaban baja actividad enzimática de α -GalA y eran portadores de GVUS y se llevó a cabo, entre Noviembre del año 2015 y Enero del 2016, una valoración clínica realizando, previa obtención de consentimiento informado, una completa historia clínica (recogiendo datos sociodemográficos, sintomatología sugestiva de EF desarrollada en ellos y sus familiares afectos, así como cualquier otro tipo de manifestación clínica) y una exhaustiva exploración física. Se recogió una nueva muestra sanguínea donde se determinó de nuevo la actividad enzimática de α -GalA y se secuenció el gen *GLA*. A continuación, se realizó una cuantificación de LysoGb3, mRNA y cantidad de proteína, así como un estudio de metilación. (Ver Anexo: Hoja de Recogida de Datos Estudio Caso - Control. En dicha Hoja de Recogida de Datos no figura la cuantificación de LysoGb3 ya que dicha cuantificación se determinó posteriormente a la realización de dicho

documento). A lo largo de los años 2017, 2018 y 2019 se realizaron revisiones sucesivas de la historia clínica de dichos sujetos. Por otro lado, la formación del grupo control se llevó a cabo a lo largo de los años 2015-2016. Se realizaba en el mismo momento, una entrevista clínica, una exploración física y se recogía una muestra sanguínea, todo ello previa obtención de la firma del consentimiento informado. En dicha muestra sanguínea se analizó la actividad enzimática α -GalA, se secuenció el gen *GLA*, se determinó LysoGb3, mRNA y cantidad de proteína, así como se llevó a cabo un estudio de metilación.

La doctoranda ha participado en el diseño del estudio y la interpretación de los datos obtenidos tanto para el cribado neonatal como para el estudio caso-control. En este último, la doctoranda ha realizado asimismo el reclutamiento de los pacientes, la recogida de muestras para análisis y el seguimiento clínico. La recogida y procesado de las muestras del estudio de cribado neonatal ha sido realizada por parte de la Unidad de Diagnóstico y Tratamiento de Enfermedades Metabólicas Congénitas del Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela. El procesamiento de las muestras del estudio caso-control se ha realizado en los laboratorios del Instituto de Investigación Sanitaria Galicia Sur, ubicados en Vigo en el Hospital Álvaro Cunqueiro

4.4 PROCESADO DE MUESTRAS

El análisis de las muestras del estudio de cribado neonatal se realizó en los laboratorios de la Unidad de Diagnóstico y Tratamiento de Enfermedades Metabólicas Congénitas del Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela.

El análisis de las muestras del estudio caso-control (a excepción del estudio de LysoGb3 como se detalla posteriormente) se realizó en los laboratorios del Instituto de Investigación Sanitaria Galicia Sur, ubicados en Vigo en el Hospital Álvaro Cunqueiro.

La determinación de la actividad enzimática de α -GalA se realizó por fluorimetría en muestras de sangre en forma de gota seca según el método de Chamoles (192). Se utilizó fluorímetro Twinkle LB 970. El ensayo se realizó en tampón fosfato-citrato 0.15M a pH 4.2, usando 4-

metilumbeliferil- α -D-galactopiranoside 4mM (4-MU, #44039, Glycosinth) como sustrato y en presencia de N-acetil-D-galactosamina 50mM (Ver Figura 10). La actividad enzimática se calculó con referencia a una recta patrón (Fluorescencia/concentración de sustrato) y se expresó como μ moles de sustrato hidrolizado por hora y litro de sangre. Las muestras se midieron por duplicado.

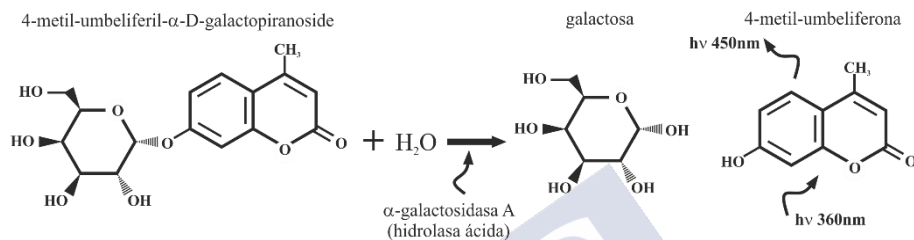


Figura 10 Reacción de la enzima α -GalA . (Imagen de elaboración propia)

Para la secuenciación de *GLA* se utilizó un termociclador (Applied Biosystems GeneAmp PCR System 9700) y un secuenciador automático por electroforesis capilar AB PRISM 310, con software para análisis de secuencias (Genescan). Se realizó con método de Sanger sobre fragmentos de Ácido Desoxiribonucleico (DNA) correspondientes a los 7 exones que forman el gen. Estos fragmentos se obtienen por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando la muestra de gota seca y primers específicos complementarios a las secuencias intrónicas que flanquean cada exón.

La determinación de LysoGb3 se llevó a cabo en el Laboratorio lisosomal del Centro Médico Universitario de Hamburgo-Eppendorf localizado en Hamburgo, Alemania, mediante el envío de muestras debidamente conservadas. Se realizó con el análisis de muestra en papel de filtro. Se duplicó el análisis en todas las muestras. Los niveles de LysoGb3 se determinaron mediante espectrometría tandem masas de ionización por electroespray y cromatografía líquida de alta prestación utilizando un dispositivo médico clase 1 Shimadzu 8050 y adaptando el método descrito por Gold y colaboradores (193). Se utilizó un estándar interno para la cuantificación de LysoGb3 (se cubrió el rango de 0 a 120 ng/mL, límite bajo de cuantificación 0.3 ng/mL). Para el control de calidad se utilizaron 3 niveles de calibración (3, 30 y 100 ng/mL). El

rango de referencia se definió como el intervalo de predicción que incluye el 95 % de los valores del grupo de referencia (punto de corte < 1.1 ng/mL).

El análisis de transcritos de *GLA* se llevó a cabo con el equipo para PCR en tiempo real (qPCR) AB Prism7300, Applied Biosystem, y se utilizó el software de análisis ABIprism. Se realizó mediante qPCR con sondas Taqman para medir los niveles de expresión del gen y determinar eventuales alteraciones de la expresión del mRNA. De muestras de sangre periférica (10 ml de sangre recogido con EDTA) se purificaron los leucocitos por depleción de las otras poblaciones y se extrajeron simultáneamente RNA total, DNA y proteínas usando el kit All-Prep (Qiagen). El mRNA se retrotranscribió con Ominiscript kit, (Qiagen) usando un cebador de oligodTs. El c-DNA obtenido se utilizó para el análisis cuantitativo de los transcritos (Taqman probes *GLA* #186786874 aparato 7300 Abiprism de Life Technologies). La cantidad de transcrito se calculó en referencia a un gen constitutivo (GAPDH #186786874) utilizando el método de los ciclos celulares (Pfaffl, 2001) y normalizando los datos a la muestra control. Las mediciones se realizaron por triplicado y se realizaron 3 experimentos independientes en cada sujeto a estudio. En cada experimento se utilizaron diferentes muestras control para la normalización de los datos.

El estudio semicuantitativo de la expresión de α -GalA a nivel de proteína se realizó mediante Western blot utilizando un anticuerpo específico para la enzima (Abcam#). Previamente se corrieron las muestras obtenidas de la lisis de leucocitos de pacientes en un gel de polyacrilamida en condiciones desnaturizantes para permitir la separación de las muestras. (Biorad#). Las proteínas se transfirieron a membranas Transblot Turbo (#1704157) de Biorad utilizando el analizador ChemiDoc MP Imaging System. Se utilizó la expresión del marcador de lisosomas LAMP1 como gen de referencia para la cantidad de proteína. Una vez tratadas las membranas con anticuerpos secundarios HRP conjugados, se reveló la señal luminiscente de las bandas con Clarity Western ECL substrate (#170-5060). Las imágenes se adquirieron con el analizador de imagen ImageLab (Biorad).

El estudio de metilación se realizó mediante el análisis del DNA tratado con bisulfito utilizando la PCR específica de metilación

(methylation-specific PCR, MSP) y la secuenciación del DNA tratado (Bisulfite sequencing). Se estudió la región promotora de *GLA* (-152_+193), que contiene las variaciones intrónicas c.-10C>T y c.-12G>A, el entorno de la variación p.(Ala143Thr) (g.11068 – g.11271) y el entorno de la variación p.(Asp313Tyr) (g.14253 – g.14563). Para la conversión con bisulfito se utilizó el kit EZ DNA Methylation-Direct Kit (Zymo Research) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se utiliza el programa MethPrimer (194) para la identificación de las islas CpG, el diseño de los juegos de cebadores MSP (estado metilado y estado no metilado) y el de los cebadores para la secuenciación del DNA tratado. Los resultados de la amplificación específica de metilación se analizan mediante electroforesis en gel de agarosa. Para el análisis por secuenciación de los dinucleótidos CpG se realiza el clonaje de los productos de PCR en el vector pCR® 2.1-TOPO incluido en el kit comercial TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen, Life Technologies). Transformamos bacterias competentes TOP10 de *E. coli* con nuestros plásmidos mediante la técnica de choque térmico. Posteriormente se aíslan entre 3-4 colonias de cada, se crecen y se extrae el DNA plasmídico con el kit de extracción NZYMiniprep kit (Nzytech). Por último, se secuencian por Sanger a través de la empresa STABVIDA (Portugal).

4.5 ANÁLISIS DE LOS DATOS

El programa empleado para el registro de los datos será microsoft Excel. Se utilizó el software libre estadístico R para la realización del análisis estadístico de los datos

En las variables cuantitativas se ha calculado la media y la desviación estándar (DE). Se establecen los Intervalos de Confianza 95% (IC 95%) así como el nivel de significación estadística comparando grupos de media \pm DE mediante la prueba t-student. Los parámetros estadísticos estudiados en el análisis de resultados son: los valores máximo y mínimo muestral, primer, segundo y tercer cuartil, empleando la representación gráfica que se muestra esquemáticamente en la Figura 11.

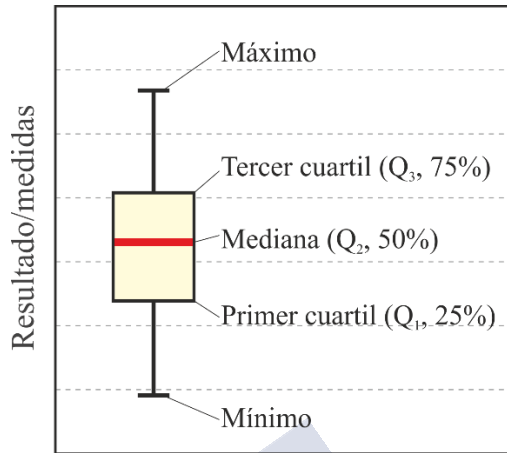


Figura 11 Representación esquemática de los parámetros estadísticos graficados. (Imagen de elaboración propia)

La correlación enzimática con el peso al nacimiento y la edad gestacional fue analizada mediante el coeficiente de correlación de Pearson. Para estudiar la asociación entre la actividad enzimática y la edad gestacional (<35 semanas Vs >35 semanas) o el peso al nacimiento (< 2500 g Vs > 2500 g) se utilizó el test χ^2 para tablas de contingencia.

El punto de corte para determinar la actividad enzimática se ajustó utilizando el percentil 0.5 y se ajustó teniendo en cuenta variables como el sexo, peso y edad gestacional. Para establecer el punto de corte apropiado se cuantificó la actividad enzimática de la α -GalA en 2168 recién nacidos sanos. La actividad media fue de 5.1 $\mu\text{mol/Lh}$ (IC 95% 5.0-5.2) con una mediana 4.57 (IC 95% 4.46-4.71). Estos valores pueden estar sobrestimados teniendo en cuenta que dicha población incluye tanto varones como mujeres. La prevalencia, el valor predictivo positivo (VPP) y la precisión del método para el protocolo diagnóstico se calculó utilizando el software MedCalc 16.4.3 (Universidad de Oostende, Bélgica)

En el análisis de las secuencias en el gen *GLA* se utilizó el software Chromas 2.4 para detectar mutaciones puntuales o pequeñas deleciones/inserciones en los exones y las regiones intrónicas cercanas. La nomenclatura aplicada en las variantes genéticas de *GLA* sigue la normativa HGVS (Human Genome Variation Society) utilizando como

referencia la secuencia LRG_672 tanto a nivel genómico como de DNA codificante (LRG_642t1) y proteína (LRG642p1).

El punto de corte óptimo en nuestra muestra en relación al acúmulo de LysoGb3 se estableció mediante la realización de curva ROC estableciendo el valor con mejor relación sensibilidad/especificidad. Los niveles de LysoGb3 se analizaron con el test t-student para comparar grupos de media +/- DE. Se determinó como significación estadística $p < 0.05$.

La cantidad de transcritos se calculó en base a la referencia del gen constitutivo GAPDH #Hs02758991, usando el método de la amplificación de ciclos ($\Delta\Delta Ct$), descrito por Pfaffl (195) y normalizando los valores a aquellos obtenidos de la muestra de calibración (valor de 1), (extracción de mRNA de voluntarios sanos). Se repitieron 3 experimentos independientes para cada sujeto usando muestras de calibración de dos individuos control diferentes. El dato cuantitativo de transcrito representado por cada sujeto es el valor medio de los tres experimentos realizados, \pm la desviación estándar. Los niveles de transcrito de *GLA* se analizaron con el test t-student para comparar grupos de media +/- DE. Se determinó como significación estadística $p < 0.05$.

Las imágenes de WB se realizaron con el programa Image Lab (Biorad) y la expresión de α -Gal A se comparó con la expresión LAMP en cada muestra. La cuantificación relativa entre las dos bandas de proteína se calculó utilizando el programa Image lab 5.2.1 de Biorad para cada muestra. Se calculó sucesivamente la media y la desviación estándar de la intensidad relativa de las bandas para cada grupo [controles, casos con la variante p.(Ala143Thr), casos con SNPs (polimorfismos de un solo nucleótido) en intrones, casos con variantes p.(Asp313Tyr)] y se analizó mediante t-test la significancia de las diferencias entre grupos.

Las secuencias obtenidas tras la realización del estudio de metilación se analizaron con el programa Chromas Pro (Technelysium Pty Ltd).

4.6 DIFICULTADES Y LIMITACIONES DEL ESTUDIO

La realización del estudio de cribado neonatal limitándose a la población perteneciente a la Comunidad autónoma de Galicia puede constituir un sesgo de selección a la hora de extrapolar nuestros resultados a otras poblaciones.

Por otro lado, el realizar el estudio de la expresión de α -GalA en una muestra aún más seleccionada (sujetos pertenecientes al área de salud de Pontevedra-Sur) vuelve a constituir de nuevo un sesgo de selección a la hora de poder extrapolar los resultados a otras poblaciones y, además, el tamaño muestral es demasiado bajo para poder encontrar diferencias significativas.

4.7 ASPECTOS ÉTICO-LEGALES

Cumplimiento de las Normas de Buena Práctica Clínica y de la Declaración de Helsinki.

Confidencialidad de la información. El tratamiento, comunicación y cesión de los datos se hará conforme a lo dispuesto por la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de protección de datos de carácter personal. Sólo el equipo y las autoridades sanitarias, que tienen el deber de guardar la confidencialidad, tendrán acceso a todos los datos recogidos por el estudio. Se podrá transmitir a terceros la información que no pueda ser identificada. En el caso de que alguna información sea transmitida a otros países, se realizará con un nivel de protección de los datos equivalente, como mínimo, al exigido por la normativa de nuestro país.

Manejo de muestras biológicas conforme a la Ley 14/2007 y el RD 1716/2011. Las muestras y los datos asociados serán guardados de forma codificada. Esta información está a cargo del investigador principal y sólo pueden acceder a ella los miembros del equipo investigador y las autoridades sanitarias en el ejercicio de sus funciones. Los Responsables de la custodia de las muestras son por un lado, en lo referente al estudio de cribado neonatal la Unidad de Diagnóstico y Tratamiento de Enfermedades Metabólicas Congénitas del Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela donde permanecen almacenadas y en lo relativo al estudio Caso-control el responsable de la custodia de las muestras es el investigador principal

(Cristina Melcón Crespo) y son almacenadas en el Instituto de Investigación Sanitaria Galicia Sur durante el tiempo necesario para realizar el estudio o de manera indefinida en el caso de que el paciente haya accedido a la conservación en la colección de muestras “Estudios de diagnósticos y de mecanismos moleculares de la Enfermedad de Fabry” nº C.0003361 dada de alta en la Red Nacional de Biobancos cuya responsable es la Dra Saida Ortolano.

Ver Anexo: Modelo de consentimiento informado Estudio Descriptivo Cribado neonatal y Modelo de consentimiento informado Estudio Caso -Control.

Obtenido el dictamen favorable del Comité de Ética de la Investigación Clínica de Galicia para el estudio del Cribado Neonatal con fecha 5/03/2009 (Código de Registro 2008/390) (Ver Anexo: Aprobación del Comité de Ética Estudio Cribado Neonatal) y el dictamen favorable del Comité de Ética de la Investigación de Pontevedra-Vigo-Ourense para el estudio caso-control con fecha 14/07/2015 (Código de Registro 2015/464) (Ver Anexo: Aprobación del Comité de Ética Estudio Caso - Control).



5

Resultados



5 Resultados

En este apartado se muestran los resultados del estudio de cribado neonatal que comenzó en el año 2008 y se continuó en una segunda fase, 10 años después, con el estudio de los sujetos portadores de GVUS del área sanitaria de Vigo. En la Figura 12 se detalla un cronograma de actuación del trabajo realizado.

5.1 ESTUDIO DESCRIPTIVO

En nuestro estudio de cribado neonatal [ver Anexo Artículo: *Newborn screening for Fabry disease in the north-west of Spain* (196)], el único llevado a cabo en España, se ha realizado analizando, en muestra de papel de filtro recogida entre el 3º y 5º día de vida, a los recién nacidos en la Comunidad Autónoma de Galicia desde el 1 de enero hasta el 31 de diciembre del año 2008. En total se analizaron 14,600 individuos (7575 hombres y 7025 mujeres).

El punto de corte para considerar una baja actividad enzimática se estableció en 1.7 $\mu\text{mol/Lh}$ (correspondiente al percentil 0.5 de la cohorte de datos analizados) si bien posteriormente se ajustó a 2 $\mu\text{mol/Lh}$ al tener en cuenta las variables con las que se correlacionó (edad gestacional y peso al nacimiento) para evitar falsos negativos ya que además de que las mujeres heterocigotas presentan una actividad enzimática mayor, en los recién nacidos prematuros y con bajo peso también se objetivan actividades enzimáticas mayores comparados con los recién nacidos a término y con peso adecuado a la edad gestacional.

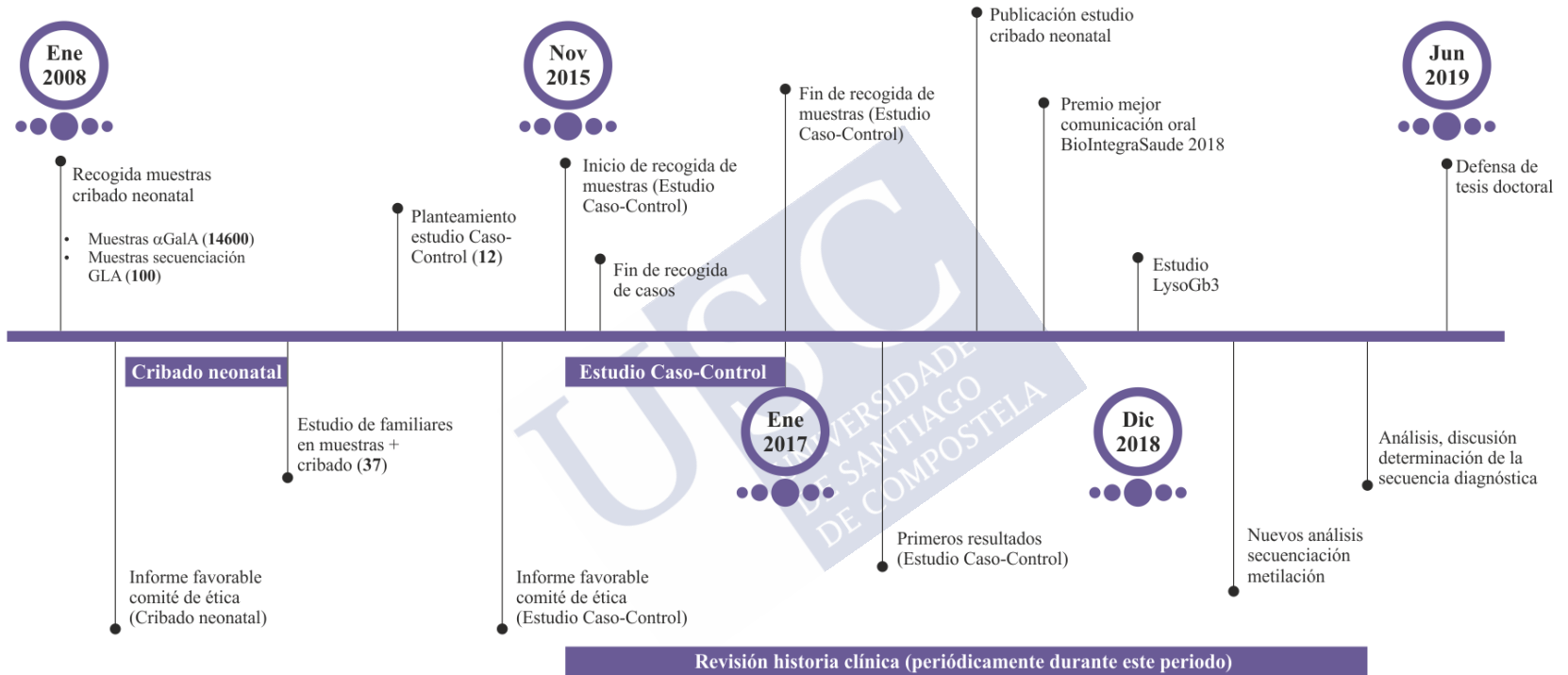


Figura 12 Cronograma del estudio.

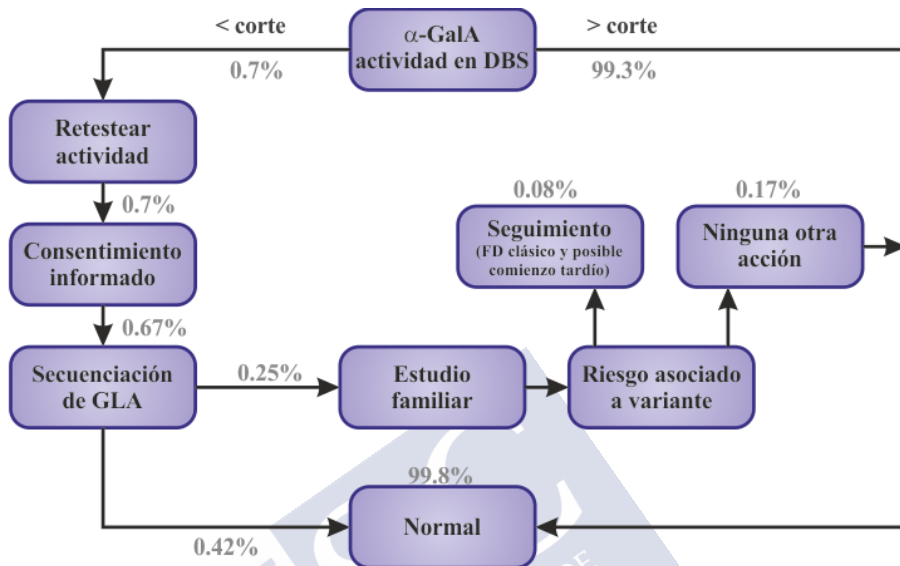


Figura 13 Resultados del estudio del cribado neonatal (el porcentaje se refiere al % de sujetos identificados en cada paso; DBS = Dried Blood Spot)

Los resultados obtenidos en cada paso del estudio se detallan en la Figura 13. Se objetivó disminución de la actividad enzimática de α -Galactosidasa en 106 muestras (0.7%) pudiendo realizar la secuenciación del gen *GLA* (previa obtención del consentimiento informado) en 101 de las muestras (68 varones y 33 mujeres). Se detectaron variantes genéticas del gen *GLA* en 37 sujetos (ver resultados detallados en la Tabla 15).

Tabla 15. Variantes gen *GLA* halladas en Cribado Neonatal

Pacien te	Sexo	Actividad en el primer test (μmol/Lh)	Actividad en el segundo test (μmol/Lh)	Variante genética
1	M	0.6	0.6	p.M290I;c.870G>A, c.-10C>T, c.640-16A>G
2	F	1.6	1.6	p.F18Y;c.53T>A, wt
3	F	2.0	1.5	c.376A>G;p.S126G, c.640-16A>G, wt
4	M	1.7	1.4	p.(Ala143Thr)
5	F	1.7	1.9	p.(Ala143Thr), wt
6	M	0.7	1.1	p.(Ala143Thr)
7	M	1.7	1.3	c.352C>T;p.R118
8	F	1.4	1.6	c.352C>T;p.R118, wt
9	M	1.1	1.5	c.352C>T;p.R118
10	M	1.4	1.0	c.352C>T;p.R118
11	M	1.7	1.6	c.352C>T;p.R118
12	M	2.0	1.8	c.352C>T;p.R118
13	F	1.9	1.5	p.(Asp313Tyr), c.-10C>T, c.640-16A>G, wt
14	M	1.9	1.2	p.(Asp313Tyr)
15	M	1.8	1.9	p.(Asp313Tyr)
16	M	1.7	1.6	p.(Asp313Tyr)
17	F	1.9	1.7	c.-10C>T, wt
18	F	1.9	1.8	c.-10C>T, wt
19	M	0.6	0.3	c.-10C>T
20	M	1.4	1.8	c.640-16A>G
21	F	1.8	1.6	c.640-16A>G, wt
22	F	1.5	2.0	c.640-16A>G, wt
23	M	1.3	1.1	c.640-16A>G
24	F	1.4	1.9	c.640-16A>G, wt
25	F	1.8	1.8	c.640-16A>G, wt
26	M	1.3	1.9	c.640-16A>G
27	F	1.6	1.8	c.640-16A>G, wt
28	M	1.2	1.8	c.-10C>T, c.640-16A>G
29	F	1.7	2.0	c.-10C>T, c.640-16A>G, wt
30	M	1.4	1.5	c.-10C>T, c.640-16A>G
31	F	1.8	0.9	c.-10C>T, c.640-16A>G, wt
32	M	1.6	1.8	c.-10C>T, c.640-16A>G
33	F	1.9	1.7	c.-10C>T, c.640-16A>G, wt
34	M	1.8	1.6	c.-10C>T, c.640-16A>G
35	M	1.9	1.9	c.-10C>T, c.640-16A>G
36	F	2.0	1.9	c.-10C>T, c.640-16A>G, wt
37	F	1.9	1.7	c.-10C>T, c.640-16A>G/, wt

Una de estas variantes hallada en un paciente varón, está considerada como patogénica (p.M290I;c.870G>A) productora de fenotipo clásico ya que ha sido previamente descrita (197). En esta

variante se produce la sustitución de metionina en la posición 290 con isoleucina traduciéndose en un defecto del ensamblaje de la proteína.

Otra de las variantes encontradas (p.F18Y;c.53T>A) en una paciente heterocigota no ha sido detectada con anterioridad ni recogida en *Human Mutation Database* si bien una variante que afecta al mismo residuo y está sustituida con un aminoácido con características similares está descrita como patogénica (29). En nuestra variante se produce una sustitución en la posición 18 de fenilalanina por tirosina y en la variante descrita en la literatura la sustitución producida en dicha posición 18 es fenilalanina por serina. Tanto serina como tirosina son aminoácidos más polares que la fenilalanina lo que produce alteración en las interacciones hidrofóbicas de la enzima y de esta forma afectan a su estabilidad. La niña portadora de esta variante no presenta sintomatología compatible con la EF en el momento actual y su madre portadora de la misma variante presenta lesiones cutáneas sin filiar. Otros familiares de la madre, que rechazaron la realización del estudio genético, presentan lesiones cutáneas *angiokeratoma-like* (en uno de los familiares se realizó biopsia de la lesión objetivando la presencia de inflamación y células alargadas con depósito de material birrefringente en su interior) y otra sintomatología sugestiva pero no específica de la EF (dolor abdominal recurrente, pérdida auditiva, prurito en las extremidades...). Por todo ello, podríamos clasificar la variante (p.F18Y;c.53T>A), como probablemente patogénica.

El resto de variantes halladas se consideran GVUS. Se detectaron tanto el polimorfismo c.937G>T;p.(Asp313Tyr) como otras variantes con patogenicidad dudosa (c.352C>T;p.R118C, c.427G>A; p.(Ala143Thr), c.376A>G;p.S126G,) y numerosas variantes intrónicas (g.5051C>T;c.-10C>T, g.14002A>T;c.640-16A>G) en asociación entre ellas.

La prevalencia estimada en varones es del 0.013 % (1:7575 varones) similar a la descrita en otros programas de cribado mencionados anteriormente (Ver Tabla 9). El VPP es de 1.47 % con una precisión de 99.12 % (IC 98.9-99.3) con una tasa de FP de 0.88 %. Debido a que la actividad enzimática no es concluyente en las mujeres no es posible calcular la prevalencia en esta población partiendo de la

actividad enzimática como método de cribado, ya que podríamos tener en nuestra cohorte falsos negativos.

En todo caso, si estudios posteriores confirmasen a la variante p.F18Y;c.53T>A como patogénica podríamos concluir que la prevalencia estimada en nuestra población de forma global, incluyendo tanto varones como mujeres, es de 0.014 % (1:7297) con VPP de 2%, precisión de 99.3 % (IC 75-100) y tasa de FP de 0.67 % que son valores similares a los obtenidos para la población masculina. Esto sugiere que el porcentaje de falsos negativos en la población estudiada no es significativo, a pesar de utilizar la actividad enzimática como método de cribado.

5.2 ESTUDIO CASO - CONTROL

5.2.1 Sujetos a estudio

Se incluyeron en el análisis un total de 12 sujetos portadores de GVUS que cumplieran los criterios de inclusión, que constituyen el total de los sujetos susceptibles a estudio. 8 de ellos eran mujeres (66 % del total).

Para el grupo control se recogieron muestras de 16 pacientes (43% mujeres) todos ellos con actividades, enzimáticas de α -GalA dentro de la normalidad y sin presentar alteraciones en las regiones del gen *GLA* estudiadas, comprobado por secuenciación Sanger.

Para los casos se secuenciaron unos tramos más amplios de regiones intrónicas para comprobar la presencia de otros SNPs en intrones frecuentemente detectados en cribado de población adulta con riesgo de EF (198) y se confirmó que en 9 de ellos se hallaban más de 2 SNPs. En la Figura 14 se muestran las GVUS detectadas en los sujetos caso a estudio.

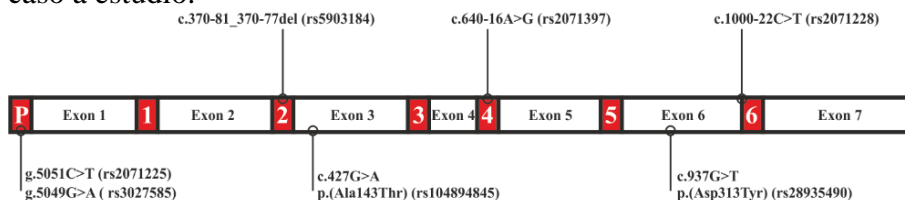


Figura 14 GVUS detectadas

En la Tabla 16 se detallan los datos obtenidos de los casos y en la Tabla 17 la información detallada de los controles.

Tabla 16. Datos Sujetos Caso (Portadores GVUS) (M=masculino; F=femenino)

Muestra	Sexo	Actividad Enzimática	Genotipo
15-01-F	F	1,9/1,5	c. -10C>T, c.370-81_370-77del, c.640-16A>G, p.(Asp313Tyr), c.1000-22C>T
15-02-F	F	1,7/1,9	p.(Ala143Thr)
15-03-F	F	2/1,9	c. -10C>T, c.370-81_370-77del, c.640-16A>G, c.1000-22C>T
15-04-F	M	1,9/1,9	c. -10C>T, c.370-81_370-77del, c.640-16A>G, c.1000-22C>T
15-05-F	F	1,9/1,7	c. -10C>T, c.370-81_370-77del, c.640-16A>G, c.1000-22C>T
15-06-F	F	1,4/1,9	c. -12G>A, g.5051C>T, c.370-81_370-77del, c.640-16A>G, c.1000-22C>T
15-07-F	F	1,9/1,7	c. -10C>T, c.370-81_370-77del, c.640-16A>G, c.1000-22C>T
15-08-F	M	0,7/1,1	p.(Ala143Thr)
15-09-F	F	1,9/1,8	c. -10C>T, c.370-81_370-77del, c.1000-22C>T
15-10-F	M	1,7/1,6	p.(Asp313Tyr)
16-11-F	F	1,8/1,8	c.370-81_370-77del, c.640-16A>G, c.1000-22C>T
16-12-F	M	1,8/1,6	c. -10C>T, c.370-81_370-77del, c.640-16A>G, c.1000-22C>T

Tabla 17. Datos Sujetos Control (Sanos) (M=masculino; F=femenino; SNP= polimorfismo de un solo nucleótido)

Muestra	Sexo	Actividad Enzimática	Genotipo
15-01-C	M	10,51	no SNPs en región promotora, intrón 2, 4, 6
16-02-C	M	5,6	no SNPs en región promotora, intrón 2, 4, 6
16-03-C	F	10,75	no SNPs en región promotora, intrón 2, 4, 6
16-04-C	M	9,8	no SNPs en región promotora, intrón 2, 4, 6
16-05-C	M	6,08	no SNPs en región promotora, intrón 2, 4, 6
16-06-C	F	16,3	no SNPs en región promotora, intrón 2, 4, 6
16-07-C	M	15,07	no SNPs en región promotora, intrón 2, 4, 6
16-08-C	F	16,19	no SNPs en región promotora, intrón 2, 4, 6
16-09-C	M	13,46	no SNPs en región promotora, intrón 2, 4, 6
16-10-C	M	10,39	no SNPs en región promotora, intrón 2, 4, 6
16-11-C	F	10,93	no SNPs en región promotora, intrón 2, 4, 6
16-12C	M	9,75	no SNPs en región promotora, intrón 2, 4, 6
16-13C	M	9,09	no SNPs en región promotora, intrón 2, 4, 6
16-14C	F	10,88	no SNPs en región promotora, intrón 2, 4, 6
17-15C	F	9,79	no SNPs en región promotora, intrón 2, 4, 6
17-16C	F	13,78	no SNPs en región promotora, intrón 2, 4, 6

5.2.2 Manifestaciones Clínicas Sujetos

Ninguno de los 12 sujetos portadores de GVUS analizados (edad cronológica actual de 10-11 años) presenta manifestaciones clínicas propias de la EF tal y como se detalla en la Tabla 18. Ninguno de los pacientes refiere dolor del tipo neuropático, lesiones cutáneas sugestivas de angioqueratoma (el sujeto 4 presenta una lesión cutánea en el muslo que tras realización de biopsia se tipificó como un nevus fusocelular y otra lesión en el tobillo izquierdo etiquetada como nevus de células fusiformes pigmentado) o manifestaciones gastrointestinal frecuentes en los pacientes con EF en la edad pediátrica. El paciente 10 presenta hipoacusia en relación a una displasia coclear.



Tabla 18. Manifestaciones Clínicas Niños Portadores GVUS

Paciente	Enfermedades	Edad de presentación	Tratamiento
1	Invaginación intestinal	24 meses	-
	Diarrea funcional	<6 años	-
	Tics motores transitorios	6 años	-
	Tiroiditis autoinmune subclínica	11 años	-
2	Cefalea tensional (RM SNC normal)	10 años	-
	Actitud cifoescoliótica	10 años	-
	Dismetría leve MMII	10 años	-
3	-	-	-
4	Nevus fusocelular pigmentado en muslo	9 años	Resección
	Nevus de células fusiformes pigmentado en tobillo izquierdo	10 años	Resección
5	BRD completo	9 años	-
	Deficiencia de acil-CoA deshidrogenasa de cadena corta	Nacimiento	Riboflabina
	Portadora heterocigota (p.Val282Leu) en gen CYP21A2	10 años	-
6	2 crisis febriles atípicas	12 y 30 meses	-
7	Pigmentaciones dentales	11 años	-
8	Actitud cifoescoliótica	9 años	-
	Dismetria Miembros inferiores	9 años	-
9	-	-	-
10	Displasia coclear-hipoacusia	2 años	-
	Trastorno del Espectro Autista/Trastorno por Déficit de Atención e Hiperactividad	6 años	Tratamiento Psicoeducativo
	-	-	-
11	-	-	-
12	Fractura de fémur	8 meses	Inmovilización
	Tic fónico	10 años	-
	Valoración cardiológica normal por sospecha cardiomegalia	10 años	-

5.2.3 Manifestaciones Clínicas Familiares

Ninguno de los familiares de los pacientes portadores de GVUS en el gen *GLA* presenta manifestaciones clínicas sugerentes de EF (ver Tabla 19). Es necesario destacar que el abuelo del paciente 3 ha fallecido por MCPH. Desgraciadamente en este sujeto se desconoce si la variante genética es heredada en rama materna o paterna ya que no consintieron la realización del estudio en los progenitores.

Tampoco en el sujeto 1 se realizó el estudio genético en los progenitores al no emitir su consentimiento. En el sujeto 12 no se encontró la variante del gen *GLA* ni en el padre ni en la madre. En el sujeto 6 sólo pudo ser estudiada la madre, no siendo portadora de la variante genética de su hija.

Tabla 19. Manifestaciones Clínicas Familiares

Paciente	Grado de parentesco	Enfermedad
1	Madre Tío de la madre Madre de la abuela materna	Hipotiroidismo IAM ACV a los 60 años
2	-	-
3	Padre Abuelo paterno Padre abuelo materno	Elevación CPK. Arritmias MCPH (fallecido) Marcapasos a los 50 años
4	Abuela materna Bisabuelo materno	ACV a los 78 años ACV
5	Abuela materna	IAM a los 54 años (fallecida)
6	Padre	Atopia. HTA
7	Padre	Arritmia cardíaca
8	Padre Abuelo materno	Arritmia cardíaca Bypass a los 48 años
9	-	-
10	-	-
11	Abuelo materno Hermana del padre	IAM a los 55 años Fallecida RN por malformación cardíaca
12	Hermana del abuelo materno	Monorreno

5.2.4 Determinación de LysoGb3

Para establecer el punto de corte óptimo del biomarcador LysoGb3 en nuestra muestra se calculó curva ROC. Se estableció como punto de corte el valor 3,95 ng/mL con una sensibilidad 0,42 (IC 95% 0,10-0,74) y una especificidad 0,81 (IC 95% 0,59-1). El área bajo la curva fue de 0,63 (IC 95% 0,42-0,84).

Dicho punto de corte fue superado por cinco sujetos en el grupo de los casos (Sujetos 2, 6, 7, 8 y 9) y tres en el grupo control (7, 8 y 9). El sujeto 2 del grupo Caso, portador de la variante p.(Ala143Thr), supera en 2,45 puntos el valor calculado como punto de corte mientras que el sujeto 8 del grupo Caso, también portador de la variante p.(Ala143Thr), supera dicho punto de corte en 1 punto. De forma detallada se describen en la Tabla 20 los valores de LysoGb3 en los casos y en la Tabla 21 los valores de LysoGb3 en los controles.

5. RESULTADOS

Tabla 20. Datos LysoGb3 en Sujetos Casos (Portadores GVUS) (M=masculino; F=femenino)

Muestra	Sexo	Actividad Enzimática	LysoGb3 (ng/mL)	Genotipo
15-01-F	F	1,9/1,5	2,9	c. -10C>T, c.370-81_370-77del, c.640-16A>G, p.(Asp313Tyr), c.1000-22C>T
15-02-F	F	1,7/1,9	6,4	p.(Ala143Thr)
15-03-F	F	2/1,9	3,1	c. -10C>T, c.370-81_370-77del, c.640-16A>G, c.1000-22C>T
15-04-F	M	1,9/1,9	2,6	c. -10C>T, c.370-81_370-77del, c.640-16A>G, c.1000-22C>T
15-05-F	F	1,9/1,7	2,9	c. -10C>T, c.370-81_370-77del, c.640-16A>G, c.1000-22C>T
15-06-F	F	1,4/1,9	4	c. -12G>A, g.5051C>T, c.370-81_370-77del, c.640-16A>G, c.1000-22C>T
15-07-F	F	1,9/1,7	4,1	c. -10C>T, c.370-81_370-77del, c.640-16A>G, c.1000-22C>T
15-08-F	M	0,7/1,1	5	p.(Ala143Thr)
15-09-F	F	1,9/1,8	4,3	c. -10C>T, c.370-81_370-77del, c.1000-22C>T
15-10-F	M	1,7/1,6	3,4	p.(Asp313Tyr)
16-11-F	F	1,8/1,8	3,7	c.370-81_370-77del, c.640-16A>G, c.1000-22C>T
16-12-F	M	1,8/1,6	3,7	c. -10C>T, c.370-81_370-77del, c.640-16A>G, c.1000-22C>T

Tabla 21. Datos LysoGb3 en Sujetos Control (Sanos) (M=masculino; F=femenino; SNP= polimorfismo de un solo nucleótido)

Muestra	Sexo	Actividad Enzimática	LysoGb3 (ng/mL)	Genotipo
15-01-C	M	10,51	2,6	no SNPs en región promotora, intrón 2, 4, 6
16-02-C	M	5,6	2,3	no SNPs en región promotora, intrón 2, 4, 6
16-03-C	F	10,75	3,6	no SNPs en región promotora, intrón 2, 4, 6
16-04-C	M	9,8	2,9	no SNPs en región promotora, intrón 2, 4, 6
16-05-C	M	6,08	3,8	no SNPs en región promotora, intrón 2, 4, 6
16-06-C	F	16,3	3,6	no SNPs en región promotora, intrón 2, 4, 6
16-07-C	M	15,07	4,7	no SNPs en región promotora, intrón 2, 4, 6
16-08-C	F	16,19	5,5	no SNPs en región promotora, intrón 2, 4, 6
16-09-C	M	13,46	4	no SNPs en región promotora, intrón 2, 4, 6
16-10-C	M	10,39	2,9	no SNPs en región promotora, intrón 2, 4, 6
16-11-C	F	10,93	2,5	no SNPs en región promotora, intrón 2, 4, 6
16-12C	M	9,75	2,8	no SNPs en región promotora, intrón 2, 4, 6
16-13C	M	9,09	2,9	no SNPs en región promotora, intrón 2, 4, 6
16-14C	F	10,88	3,9	no SNPs en región promotora, intrón 2, 4, 6
17-15C	F	9,79	3,9	no SNPs en región promotora, intrón 2, 4, 6
17-16C	F	13,78	3,1	no SNPs en región promotora, intrón 2, 4, 6

En el análisis del biomarcador LysoGb3 comparando el grupo caso con el grupo control se objetiva que no hay diferencias significativas entre los valores medios de LysoGb3 en el grupo de los Casos (Media

3,84 ng/mL con IC 95%: 3,24-3,44) y el grupo Control (Media 3,43 ng/mL con IC 95%: 3,02-3,86). La ausencia de significación estadística se puede explicar dado el pequeño tamaño muestral pero se objetiva como los valores son superiores en los sujetos portadores de GVUS evaluados de forma global o de forma independiente por sexos (ver Figura 15).

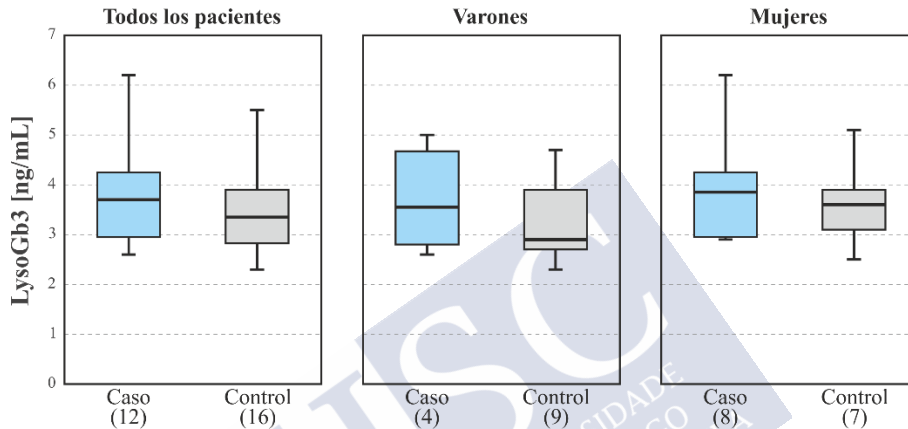
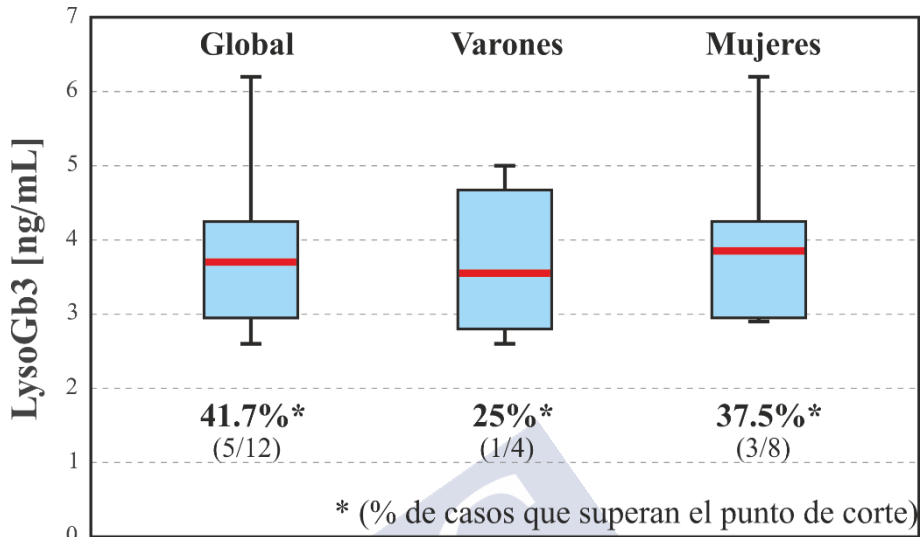


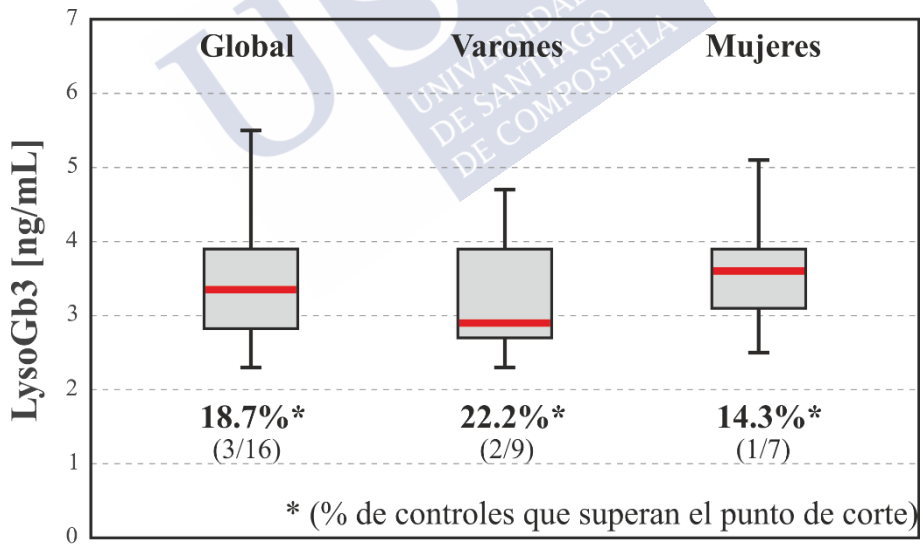
Figura 15. Valores LysoGb3 GLOBAL (entre paréntesis se indica el número de sujetos de cada grupo)

Llama la atención que tanto en el grupo de los casos como el grupo control los valores medios son superiores en las mujeres respecto a los hombres (ver Figura 16 y Figura 17).



IC (95%): (3.24-4.44) (2.70-4.65) (3.13-4.72)

Figura 16. Valores LysoGb3 CASOS. (Portadores GVUS)



IC (95%): (3.02-3.86) (2.70-3.72) (3.04-4.41)

Figura 17. Valores LysoGb3 CONTROLES. (Sanos)

5.2.5 Estudio de mRNA

Los niveles de transcritos del gen *GLA* están significativamente disminuidos en algunas de las muestras de los pacientes portadores GVUS analizadas (ver Tabla 22). Los porcentajes de transcritos en cada muestra se determinaron con respecto a una muestra calibradora en tres experimentos independientes en los que las mediciones se realizaron por triplicado. El valor indicado representa la media de los tres experimentos, más o menos la desviación estándar. Los valores indicados como “n.d” (no detectables) se deben a que por la escasa calidad de la muestra de RNA extraída no ha sido posible obtener resultados de qPCR concluyentes. En las muestras indicadas con asterisco los valores indicados proceden de un único experimento, ya que por la escasa cantidad del RNA extraído los resultados de los otros dos experimentos son inconcluyentes.

A pesar de que el error de las mediciones relativas de transcritos es bastante elevado por la heterogenicidad de las muestras calibradoras utilizadas, llama la atención como los niveles de expresión en las muestras del sujeto 7 y el sujeto 8 del grupo de los Casos están disminuidos en todos los experimentos realizados de *GLA*, a pesar de las diferentes muestras calibradoras.

5. RESULTADOS

Tabla 22. Datos Nivel de Transcritos en Sujetos Casos (Portadores GVUS) (*= un solo experimento; n.d = no detectables; M=masculino; F=femenino)

Muestra	Sexo	Actividad Enzimática	LysoGb3 (ng/mL)	Genotipo	Niveles de transcrito
15-01-F	F	1,9/1,5	2,9	c. -10C>T, c.370-81_370-77del, c.640-16A>G, p.(Asp313Tyr), c.1000-22C>T	68%±28%
15-02-F	F	1,7/1,9	6,4	p.(Ala143Thr)	77%±34%
15-03-F	F	2/1,9	3,1	c. -10C>T, c.370-81_370-77del, c.640-16A>G, c.1000-22C>T	105%*
15-04-F	M	1,9/1,9	2,6	c. -10C>T, c.370-81_370-77del, c.640-16A>G, c.1000-22C>T	20%*
15-05-F	F	1,9/1,7	2,9	c. -10C>T, c.370-81_370-77del, c.640-16A>G, c.1000-22C>T	50,77%±58%
15-06-F	F	1,4/1,9	4	c. -12G>A, g.5051C>T, c.370-81_370-77del, c.640-16A>G, c.1000-22C>T	80%*
15-07-F	F	1,9/1,7	4,1	c. -10C>T, c.370-81_370-77del, c.640-16A>G, c.1000-22C>T	30%±4%
15-08-F	M	0,7/1,1	5	p.(Ala143Thr)	75%±2%
15-09-F	F	1,9/1,8	4,3	c. -10C>T, c.370-81_370-77del, c.1000-22C>T	n.d
15-10-F	M	1,7/1,6	3,4	p.(Asp313Tyr)	75%±42%
16-11-F	F	1,8/1,8	3,7	c.370-81_370-77del, c.640-16A>G, c.1000-22C>T	48%±37%
16-12-F	M	1,8/1,6	3,7	c. -10C>T, c.370-81_370-77del, c.640-16A>G, c.1000-22C>T	n.d

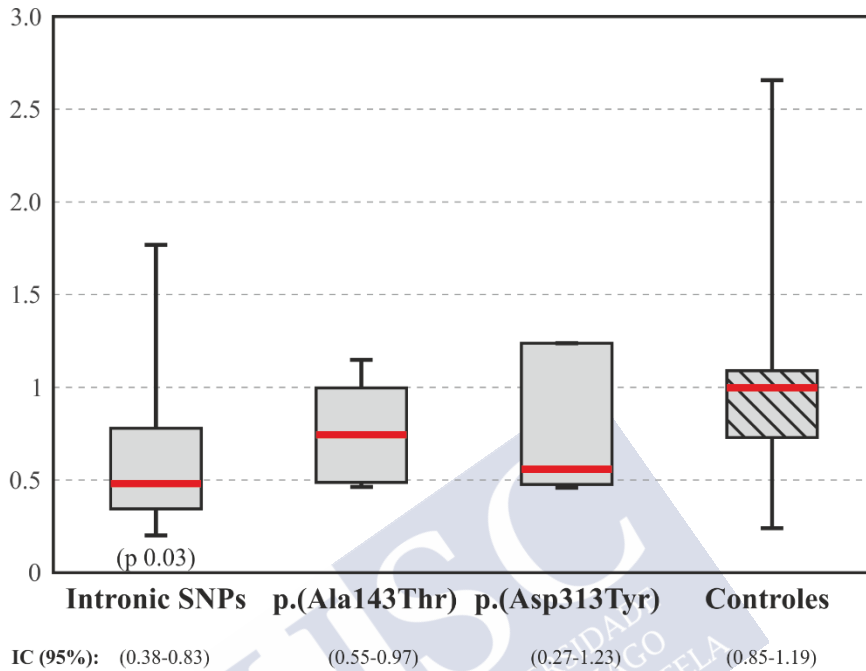


Figura 18. Niveles de transcrito: Datos globales. (SNPs= polimorfismos de un solo nucleótido)

Se objetivan diferencias estadísticamente significativas en relación al nivel de transcrito comparando todos los pacientes portadores de SNPs Vs Controles (p 0.03) (ver Figura 18). Esta diferencia se mantiene analizando de forma independiente a las mujeres (p 0.02) (ver Figura 19).

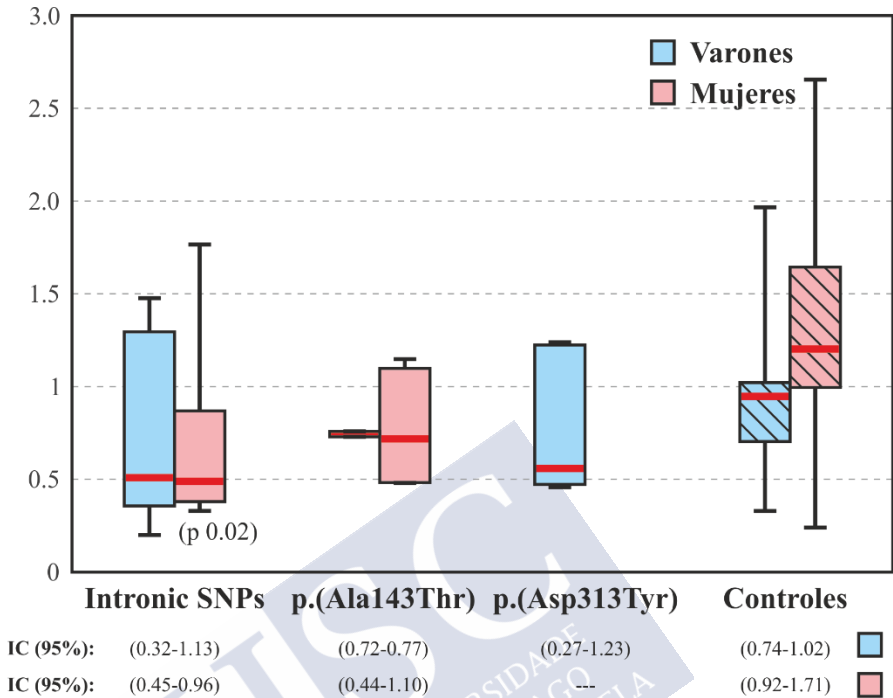


Figura 19. Niveles de transcrito: Diferencia entre sexos. (SNPs= polimorfismos de un solo nucleótido)

5.2.6 Estudio de proteína

Se realiza la determinación de los niveles de α -galactosidasaA en todos los pacientes a estudio objetivando como dichos niveles están inalterados (casos con SNPs) o aumentados de forma significativa [casos con p.(Ala143Thr) identificados como F02 y F08] a pesar de la reducida actividad de la enzima, lo que apunta a un posible acúmulo de proteína no funcional (ver Figura 20). Los niveles medios de α -galactosidasaA comparando los sujetos portadores de SNPs con sujetos control no muestra diferencias significativas (niveles medios de α -galactosidasaA en controles de 0,64 [IC 95% 0,25-1,03] Vs niveles medios de α -galactosidasaA en sujetos portadores de SNPs de 0,65 [IC95% 0,28-1,01]). Sin embargo, comparando los sujetos control con sujetos portadores de SNPs y sujetos portadores de la variante p.(Ala143Thr) sí se objetiva aumento estadísticamente significativo en este último grupo, estableciendo la posibilidad, anteriormente

comentada, de la existencia de un acúmulo de proteína en relación a una proteína no funcionante (niveles medios de α -galactosidasaA en controles de 0,39 [IC 95% 0,07-0,71], niveles medios de α -galactosidasaA en sujetos portadores de SNPs de 0,93 [IC95% 0,36-1,50], niveles medios de α -galactosidasaA en sujetos portadores p.(Ala143Thr) 1,81, [IC 95% 0,02-3,61]).

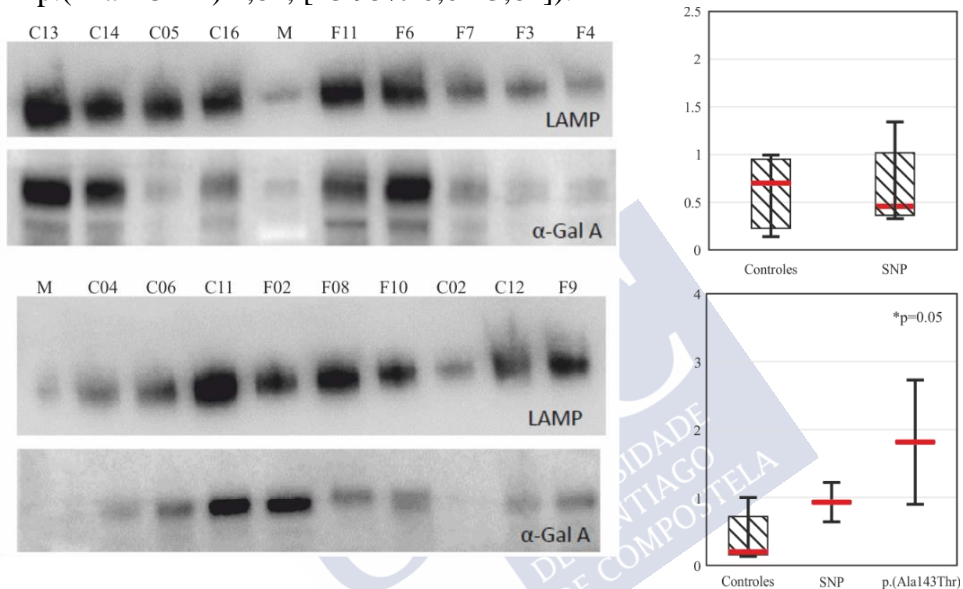


Figura 20. Niveles de Proteína (En la zona izquierda de la figura se muestran algunas de las determinaciones realizadas y en la zona derecha de la figura se muestra el total de datos analizados; sujetos CASOS identificados como “F” y sujetos CONTROL identificados como “C”; SNPs= polimorfismos de un solo nucleótido).

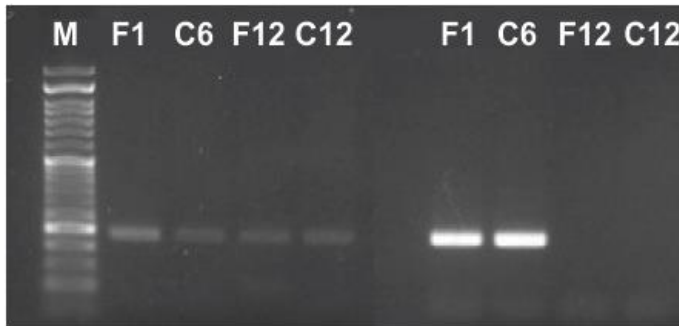
5.2.7 Estudio de Metilación

No existen diferencias en la metilación del promotor de *GLA* entre sujetos casos y controles. Se ha llevado cabo el análisis de tres sujetos portadores de variante en la región promotora (F1, F3 y F12) y de tres sujetos sanos (C6, C12 y C15). La elección de dichos sujetos se ha realizado de forma aleatoria entre los diferentes grupos apareados por sexo.

El análisis de la región promotora de *GLA*, que engloba 12 sitios CpG, no muestra diferencias entre afectados y controles. En cambio, nos permite visualizar la inactivación del cromosoma X en mujeres respecto

a los hombres, independientemente a la Enfermedad de Fabry ya que se detecta aumento de grupos metilados tanto en sujetos casos como controles mujeres y de forma significativa menor si se trata de una muestra de un varón sea caso o control (ver Figura 21).

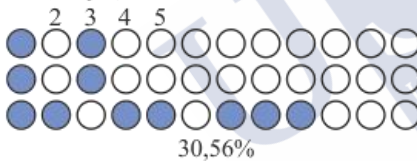
Metilación específica PCR



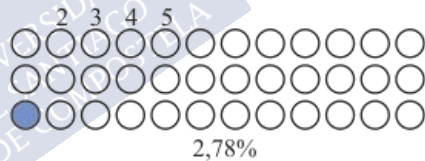
Secuenciación con Bisulfito

● CpG metilado
○ CpG no metilado

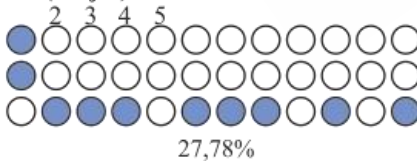
F1 (Mujer)



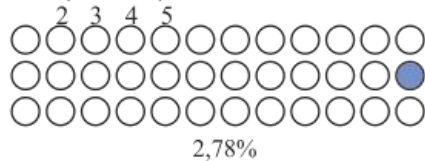
F12 (Hombre)



C6 (Mujer)



C12 (Hombre)



Posición de las citosinas analizadas próximas a las GVUS (LRG_642t1):

2: c.-33 3: c.-31 4: c.-14 5: c.-7

Figura 21. Análisis de metilación de la región promotora GLA. En la figura se representan algunas determinaciones realizadas. En la parte superior de la figura se representan algunas de las determinaciones realizadas. En la parte inferior se esquematiza en cada fila un clon del fragmento analizado representando mediante círculos cada dinucleótido CpG susceptible de metilación. (F1= Sujeto Caso 1; F12= Sujeto Caso 12; C6=Sujeto Control 6; C12=Sujeto Control 12)

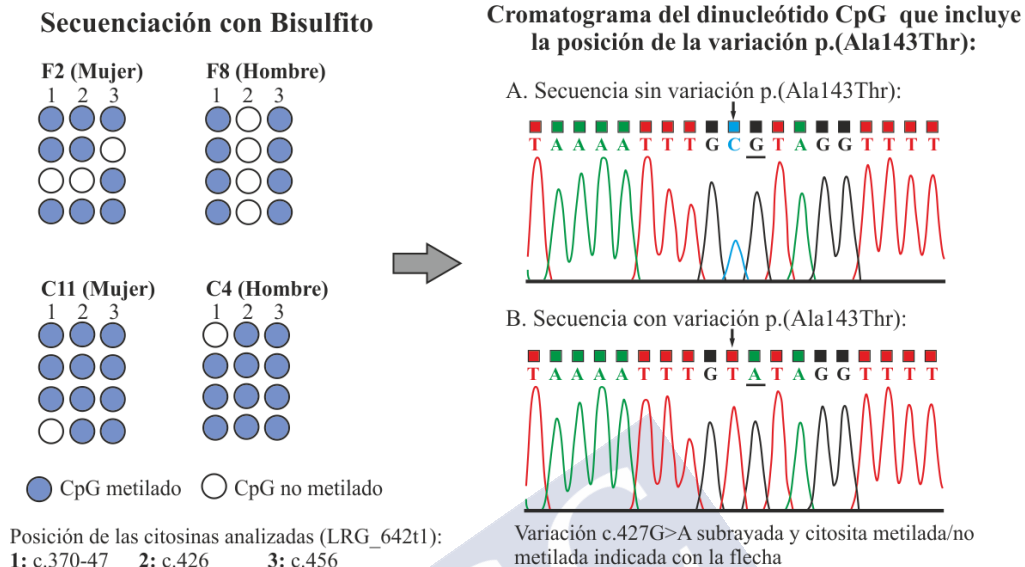


Figura 22. Análisis de metilación del entorno p.(Ala143Thr). En la parte izquierda de la figura se esquematiza en cada fila un clon del fragmento analizado representando mediante círculos cada dinucleótido CpG susceptible de metilación. En la parte derecha de la figura se representa el cromatograma de la secuencia con y sin variación. (F2= Sujeto Caso 2; F8= Sujeto Caso 8; C11=Sujeto Control 11; C4=Sujeto Control 4)

Al analizar del entorno de p.(Ala143Thr), que engloba 6 dinucleótidos CpG, nos encontramos con una alteración en el patrón de metilación en aquellos sujetos portadores de la variante p.(Ala143Thr). En dichos sujetos, la citosina que se encuentra en la posición 426 formando un dinucleótido CpG no existe, en su lugar se encuentra una timina, por lo que dicha zona, que habitualmente está metilada al constituir un dinucleótido CpG, no se puede metilar (ver Figura 22). Dicho análisis de metilación se ha realizado en todos los sujetos de la muestra portadores de la variante p.(Ala143Thr) (Sujeto Caso 2 y 8) y se ha comparado con dos sujetos control seleccionados de forma aleatoria apareados por sexo (Sujeto Control 4 y 11).

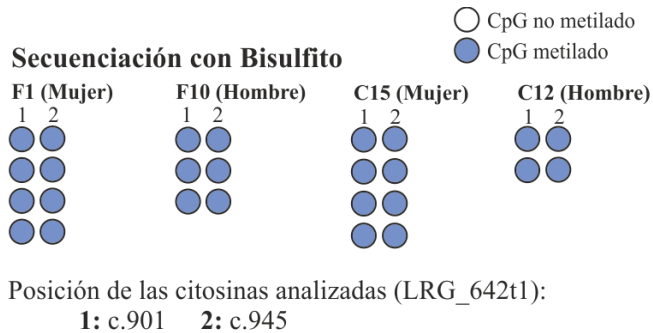


Figura 23. Análisis de metilación del entorno p.(Asp313Tyr). Se esquematiza en cada fila un clon del fragmento analizado representando mediante círculos cada dinucleótido CpG susceptible de metilación (F1= Sujeto Caso 1; F10= Sujeto Caso 10; C15=Sujeto Control 15; C12=Sujeto Control 12)

El análisis del entorno de p.(Asp313Tyr), que engloba 2 dinucleótidos CpG, no muestra diferencias entre afectados y controles y se encuentra metilado (ver Figura 23). Para su estudio se ha realizado el análisis en todos los sujetos de la muestra portadores de la variante p.(Asp313Tyr) (Sujeto Caso 1 y 10) y se ha comparado con dos sujetos control seleccionados de forma aleatoria apareados por sexo (Sujeto Control 12 y 15).





6

Discusión



6 Discusión

Este cribado constituye el primero realizado en nuestro país en el ámbito neonatal si bien cribados en otras poblaciones ya han sido realizados en España con anterioridad (42,198–200).

Los datos de prevalencia de la EF obtenidos en nuestro estudio (1:7575 varones portadores de fenotipo clásico) son mayores de los descritos inicialmente, en 1999 Meikle y colaboradores describieron prevalencias 1:117000 (39), pero similares a los descritos en otros programas de cribado neonatal realizados en distintas regiones en el mundo (ver 1.2.1 Cribado Neonatal) describiendo prevalencias entre 1:7000 y 1:3000 según incluyan sólo pacientes portadores de variantes causante de fenotipo clásico o GVUS respectivamente (201–203). Van der Tol describió como el 90 % del total de variantes del gen *GLA* encontradas en los estudios de cribado eran GVUS (161). Se están realizando estudios de seguimiento en los sujetos portadores de variantes del gen *GLA* detectados en cribados neonatales para determinar si dichos sujetos desarrollan sintomatología compatible con EF lo que es esencial para poder establecer un diagnóstico definitivo (41).

Las variantes más frecuentemente encontradas en los estudios de cribado realizados en Europa (161) son c.427G>A; p.(Ala143Thr), p.R112H y c.937G>T; p.(Asp313Tyr) también presentes de forma frecuente en la población general [p.(Ala143Thr) = 0.09%, c.335G>A; p.R112H = 0.04% y p.(Asp313Tyr) = 0.3%] (96,161). En nuestro estudio varios pacientes portadores de estas variantes han sido descritos. Dada su frecuencia en la población general antes descrita, algunos autores recomiendan realizar biopsia para confirmar la presencia de depósitos antes de considerar a los pacientes portadores de estas variantes como enfermos (96).

Múltiples variantes en secuencias intrónicas han sido descritas en el estudio, en muchos casos constituyendo haplotipos complejos. En varios estudios (163,204) se ha demostrado que estas variantes producen defectos de transcripción pero las consecuencias de dichas

alteraciones aún no han sido claramente definidas y por tanto no se puede clasificar a dichos individuos como afectados de EF.

El método escogido para la realización del cribado neonatal en este estudio presenta datos de precisión, VPP y tasa de falsos positivos similares a los descritos en otros métodos de cribado de otras patologías ya incluidas en los cribados neonatales sistemáticos. En nuestro estudio obtenemos VPP de 1.47% con una precisión de 99.12 % (CI 98.9-99.3) y una tasa de FP de 0.88 %. Para la detección neonatal de fibrosis quística se utiliza la tripsina inmunoreactiva con VPP 4% y precisión del 99.2 %, del mismo modo, para la detección neonatal del hipotiroidismo congénito se determina el valor de TSH con VPP 18% y precisión del 99.8 %.

En relación a la inclusión de la EF en los paneles de cribado neonatal existe mucha controversia. Por un lado, el Comité Asesor sobre Trastornos Hereditarios en Recién Nacidos y Niños ha rechazado la inclusión de la EF en los paneles de cribado neonatal, sin embargo, en determinados lugares, por ejemplo, en Missouri o Illinois, la EF ya forma parte dichos paneles de cribado gracias al apoyo de los padres y al desarrollo de unos adecuados protocolos de seguimiento. También en otros estados (Nuevo México o Nueva Jersey) se han desarrollado programas pilotos (41). Actualmente la discusión sobre la inclusión de la EF dentro de los programas de cribado neonatal se ha reabierto debido al desarrollo de nuevas dianas terapéuticas de administración oral como las chaperonas (24). Puntos a favor para la inclusión de la EF en los programas de cribado neonatal son tanto la prevalencia como la existencia de adecuados métodos de diagnóstico y el indiscutible efecto beneficioso del inicio precoz del tratamiento (117). Sin embargo, la existencia de un considerable número de sujetos portadores de GVUS (161) dificulta la inclusión de la EF en dichos programas de cribado. Con todo, dado los numerosos estudios que informan de prevalencias cada vez más elevadas (40,41), el gran beneficio de la inclusión en programas de tratamiento a los sujetos con EF en fases precoces (117) y el desarrollo de nuevas perspectivas terapéuticas (terapia génica, terapias reducción de sustratos...) (23,27) hacen que la EF deba ser candidata a su inclusión en los paneles de cribado neonatal.

Debido el elevado número de sujetos portadores de GVUS detectados en nuestro programa de cribado y en otros (161), es necesario poder realizar una mejor caracterización de dichas variantes para clasificar a dichos individuos de forma precisa e incluirlos correctamente en protocolos de seguimiento y tratamiento. Esto también facilitaría la inclusión de la EF en los programas de cribado sistemáticos.

En nuestro estudio detectamos 35 sujetos portadores de GVUS. Se seleccionaron los pacientes portadores de GVUS pertenecientes a nuestra área de salud Pontevedra Sur (en total 12 pacientes) para continuar el estudio y se realizó un seguimiento clínico, así como una serie de determinaciones bioquímicas y análisis moleculares para intentar realizar una mayor aproximación diagnóstica e implicación de dichas variantes del gen *GLA* en el desarrollo de EF. Solamente se continuó el estudio en los pacientes de esta área de salud ya que es en esta área donde se disponen de competencias para realizarlo. Sería importante ampliar el estudio en el resto de pacientes portadores de GVUS detectados en el programa de cribado.

En los 12 sujetos estudiados se realizó de nuevo estudio genético objetivando un mayor número de variantes del gen *GLA* que las descritas inicialmente (196) debido a la utilización de primers diferentes que incluyen fragmentos mayores de las regiones intrónicas.

De los 12 sujetos estudiados, 3 sujetos son portadores de polimorfismos del gen *GLA*, otro es portador de un polimorfismo del gen *GLA* asociado a otra serie de variantes en secuencias intrónicas y el resto de los sujetos (8) presenta una haplotipo que combina varias sustituciones de nucleótidos en secuencias intrónicas (ver Tabla 23 y Tabla 24).

Debido a la variedad de nomenclaturas que existen en la literatura en la Tabla 25 se detallan las equivalencias en diversas nomenclaturas de las GVUS detectadas en nuestra área sanitaria.

Tabla 23. Haplotipos presentes en el estudio

Nº Total Pacientes (Nº Caso)	Haplotipo
2 (2 y 8)	c.427G>A; p.(Ala143Thr)
1 (10)	c.937G>T; p.(Asp313Tyr)
1 (1)	c. -10C>T, c.370-81_370-77del, c.640-16A>G, p.(Asp313Tyr), c.1000-22C>T
5 (3,4,5,7 y 12)	c. -10C>T, c.370-81_370-77del, c.640-16A>G, c.1000-22C>T
1 (6)	c. -12G>A, c. -10C>T, c.370-81_370-77del, c.640-16A>G, c.1000-22C>T
1 (9)	c. -10C>T, c.370-81_370-77del, c.1000-22C>T
1 (11)	c.370-81_370-77del, c.640-16A>G, c.1000-22C>T

Tabla 24. Resumen Variantes gen *GLA* presentes en el estudio

Nº Pacientes	Variante Gen <i>GLA</i>
9	c.370-81_370-77del
9	c.1000-22C>T
8	c. -10C>T
8	c.640-16A>G
2	p.(Ala143Thr)
2	p.(Asp313Tyr)
1	c. -12G>A

Tabla 25. Equivalencias Nomenclatura Variantes Gen *GLA*

Región en <i>GLA</i>	DNA genómico LRG_642	DNA codificante (transcrito) LRG_642t1	Proteína LRG_642p1	ID dbSNP
Promotor	g.5049G>A	c. -12G>A	—	rs3027585
Promotor	g.5051C>T	c. -10C>T	—	rs2071225
Intrón 2	g.11074_11078del	c.370-81_370-77del	—	rs5903184
Exón 3	g.11212G>A	c.427G>A	p.(Ala143Thr)	rs104894845
Intrón 4	g.14002A>T	c.640-16A>G	—	rs2071397
Exón 6	g.14532G>T	c.937G>T	p.(Asp313Tyr)	rs28935490
Intrón 6	g.14843C>T	c.1000-22C>T	—	rs2071228

Los sujetos 2 y 8 de nuestro estudio son portadores de la variante p.(Ala143Thr). En uno de los primeros cribados neonatales realizados en Italia en 2006 (201), se describió la variante p.(Ala143Thr) como una variante de inicio tardío relacionada con patología renal. También se ha identificado en sujetos con hipertrofia ventricular izquierda (42)

y Blaydon y colaboradores en 2001 describieron un sujeto portador de esta variante que presenta un fenotipo clásico (186). En 2013 Rolfs y colaboradores describen a esta variante como ligado a infartos cerebrales en la EF (205). Sin embargo, Terry (206) realizó un estudio exhaustivo en 12 sujetos portadores de esta variante concluyendo que la asociación de las manifestaciones clínicas que dichos sujetos presentaban estaban sometidas al sesgo de selección ya que provenían de programas de cribado y la falta de depósitos de Gb3 en biopsia cardíaca y renal en varios de los sujetos cuestionaba su papel etiológico. También Lenders y colaboradores (207) concluyen en un estudio realizado en 2016 tras analizar 25 sujetos portadores de la variante p.(Ala143Thr) que dicha variante no debe ser considerada como patogénica ya que a pesar de que se han descrito pacientes con ACV portadores de esta variante y con actividad enzimática reducida la mayoría de los varones portadores de esta mutación presentan actividades enzimáticas cercanas al 50 % y niveles normales de LysoGb3. Además, debido a que se ha estimado una frecuencia poblacional de la variante de 0.078% se deberían haber identificado más casos de pacientes con EF portadores de esta variante. Consideran que los pacientes con ACV portadores de esta mutación debe ser estudiados en profundidad para descartar otras causas que expliquen dicha sintomatología y que no deben ser subsidiarios de recibir TES. Van der Tol (161) considera esta variante como GVUS en base a los estudios que no objetivan depósitos de Gb3 en muestras de biopsias cardíacas o renales y a la falta de síntomas característicos de EF en los sujetos portadores de dicha variante. En un estudio reciente se señala la posibilidad de que esta variante sea potencialmente causante de EF pero debido a su relativamente alta actividad residual deben existir otros modificadores genéticos que regulen su patogenidad por lo que los sujetos portadores de esta variante deben ser evaluados de forma individual de cara a la indicación de tratamiento (208). Arends y colaboradores (209) describieron a 3 pacientes de una misma familia portadores de esta variante que presentaban fenotipo clásico de EF, disminución de actividad enzimática y aumento de LysoGb3 y apuntan la posibilidad de que o dichos pacientes presentasen otra variante en gen *GLA* y/o existiesen otros modificadores genéticos que pueden

producir este fenotipo clásico. Existe también la teoría sobre la relación de p.(Ala143Thr) con la variante de la región promotora c.-10C>T (210) mediante la cual se considera a dicha variante de la región promotora como modificadora de la presentación clínica de sujetos portadores de p.(Ala143Thr).

En nuestro estudio no se han descrito manifestaciones clínicas sugestivas de la EF ligadas a esta variante ni en los familiares portadores. Hay que destacar que los dos pacientes portadores de dicha variante presentan ya niveles elevados de LysoGb3 (6,4 y 5 ng/mL) en contraposición a lo objetivado en otros estudios (161,206,207). También se objetivan niveles reducidos de transcritos y, además, comparando con los sujetos casos y también con los otros sujetos portadores de GVUS objetivamos un aumento de la cantidad de proteína en probable relación a proteína no funcionante. También hemos encontrado en estos sujetos la pérdida de un sitio de metilación, ya que la mutación implica la sustitución de una citosina que forma parte de un dinucleótido CpG y que normalmente se encuentra metilada. Por tanto, debido a que los dos pacientes de nuestro estudio portadores de la variante p.(Ala143Thr) (caso 2 y 8) presentan además de una baja actividad enzimática, unos niveles elevados de LysoGb3 asociados a una disminución en la transcripción de *GLA*, hace necesario, a pesar de no presentar en el momento actual ninguna manifestación clínica sugestiva de EF el mantener un seguimiento exhaustivo para vigilar la aparición de sintomatología compatible e iniciar, de ser el caso, terapia enzimática sustitutoria.

Dos de nuestros sujetos (Caso 1, combinado con otras variantes en secuencias intrónicas y caso 10) son portadores de la variante p.(Asp313Tyr) del gen *GLA*, descrita por primera vez en 1993 y cuestionada ampliamente su patogenidad desde entonces. Se relacionó inicialmente con la producción de un fenotipo clásico (178), sin embargo existen varios estudios que la relacionan con patología en el Sistema Nervioso como se detalla a continuación. Blaydon y colaboradores (186) describieron un mujer con acroparestesias portadora de dicha variante, Lenders y colaboradores (211) la consideran productora de lesiones en la sustancia blanca tras objetivar estas alteraciones en 7 miembros de una misma familia portadores de

esta variante y la ausencia de dichas lesiones en otros dos miembros de la misma familia que no presentan dicha variante genética. Refieren su relación en el daño neural y recomiendan valorar en profundidad estos sujetos. Becker corroboró dicha sospecha (212). Pero también existen autores que ponen en duda su patogenicidad (213,214). Niemann et al en 2013, demostraron en dos pacientes portadores de esta variante que a pesar de tener actividades enzimáticas bajas, no presentaban ninguna manifestación clínica sugestiva de EF y mantenían niveles normales de LysoGb3 (215). Dicha observación fue corroborada por el mismo grupo un año después detectando en varios pacientes portadores de la variante p.(Asp313Tyr) también niveles normales LysoGb3 (110). En un estudio de seguimiento a lo largo de 4 años realizado en 6 pacientes portadores de esta mutación con niveles enzimáticos y de LysoGb3 normales se objetivó que ninguno de ellos desarrolló manifestaciones clínicas desde el punto de vista renal o cardíaco, tan solo una mujer presentó AIT y en otro paciente se objetivaron lesiones en sustancia blanca (216). Algunos autores la consideran una Pseudodeficiencia (217) dado que la proteína sí llega a ser transportada dentro del lisosoma y presenta un 75 % de la actividad enzimática, objetivando disminución de la actividad e inestabilidad en pH neutro (213). Otros autores se refieren a ella como un polimorfismo ya que su frecuencia es mayor de 1 % en la población general (214,218). Recientemente en 2018 du Moulin y Muschol argumentan que el hallazgo de aumento de LysoGb3 y la mejoría clínica en las acroparestesias de un niño de 11 años portador de dicha variante tras inicio de TES contradicen la clasificación de la variante p.(Asp313Tyr) del gen *GLA* como polimorfismo inocuo (219).

Los estudios realizados en los dos sujetos portadores de la variante p.(Asp313Tyr) de nuestra serie apoyan la consideración de dicha variante como una pseudodeficiencia ya que amén de la baja actividad enzimática detectada, no se ha detectado alteraciones a nivel transcripcional, ni en relación al patrón de metilación, ni alteración a nivel de cantidad de proteína y tampoco existe acúmulo de LysoGb3 en ninguno de los dos pacientes (Valores LysoGb3 2,9 y 3,4 ng/mL).

El resto de sujetos estudiados que presentan GVUS son portadores de haplotipos complejos de variantes intrónicas. El hallazgo de dichos

haplotipos complejos de variantes intrónicas en sujetos con sospecha de EF es frecuente. En el estudio de cribado realizado por Bono y colaboradores (220) en 740 sujetos con sintomatología compatible con EF detectaron que el 99 % de ellos presentaba varias variantes formando haplotipos complejos. En nuestro estudio, todos los pacientes que presentan variantes en secuencias intrónicas son portadores de varias variantes agrupadas en haplotipos intrónicos complejos (ver Tabla 23). De entre todos ellos, el haplotipo intrónico más frecuente lo constituye c.-10C>T, c.370-81_370-77del, c.640-16A>G, c.1000-22C>T ya que lo encontramos en 5 sujetos y asociado a otra variante en otros dos sujetos. Dicho haplotipo intrónico ha sido detectado en el 8,9% del total de los sujetos estudiados en el estudio de cribado anteriormente mencionado realizado por Bono y colaboradores (220). Pisani y colaboradores (167) describieron una mujer con fenotipo clásico de EF portadora de este haplotipo intrónico (c.-10C>T, c.370-81_370-77del, c.640-16A>G, c.1000-22C>T) sin presentar alteración en las secuencias codificantes del gen *GLA*. Tuttolomondo y sus colaboradores (221) describieron también en una familia portadora del mismo haplotipo intrónico (c.-10C>T, c.370-81_370-77del, c.640-16A>G, c.1000-22C>T) diferentes fenotipos de la EF, desde afectación neurológica exclusiva hasta clínica paucisintomática, o afectación precoz de inicio en la infancia. Ninguno de nuestros sujetos portadores del haplotipos intrónicos complejos presenta sintomatología compatible con EF en el momento actual (es de destacar el abuelo paterno del sujeto número 3 ha fallecido por MCPH, en este sujeto desconocemos la rama familiar de la cual ha heredado esta variante) ni tampoco hemos demostrado aumento significativo de LysoGb3. La disminución de transcrito de *GLA* por otra parte parece ser significativa en la cohorte analizada, pero haría falta estudiar grupos de casos más amplios para obtener valores de p más bajos y generalizar las conclusiones. También Apelland y sus colaboradores (222) describieron a una familia portadora de c.640-16A>G y c.1000-22C>T que presentaba hipertrofia ventricular izquierda con depósitos Gb3 en cardiomiocitos pero sin detectar aumento de glucolípidos en sangre y orina ni reducción de la actividad enzimática de la α -galactosidasa. Por el contrario, en el estudio de cribado de EF en población con neuropatía de fibra pequeña

de etiología incierta realizado por Tanislav y colaboradores (159) encontraron, de entre 24 pacientes a estudio cuatro sujetos de sexo femenino con el haplotipo intrónico combinado recurrente (c.-10C>T, c.640-16A>G, c.1000-22C>T) que presentaban elevación significativa de biomarcadores de EF (LysoGb3 en sangre y/o Gb3 en orina) sin que presentasen en el momento del estudio ninguna otra manifestación de la EF. Gervas y colaboradores (204) describieron una familia con sintomatología compatible con EF portadora de un haplotipo intrónico complejo similar al más frecuente hallado en nuestros pacientes (c.-10C>T, c.370-81_370-77del, c.640-16A>G, c.1000-22C>T, c.369+990C>A) ya que incluía otra variante más (c.369+990C>A) y demostraron que presentaban una alteración en la expresión del *GLA* con disminución de transcritos y acúmulo de glicolípidos.

En nuestro estudio, sí que hemos detectado una disminución de transcritos en varios sujetos de ambos sexos, portadores de haplotipos complejos de variantes de secuencia intrónica como ya se había objetivado en otros estudios previamente (163,204). En este estudio realizado por Viéitez y colaboradores (198) se han descrito alteraciones en la transcripción en 2 sujetos portadores de haplotipos complejos de variantes intrónicas similar al más frecuentemente hallado en nuestra serie (c.-10C>T, c.370-81_370-77del, c.640-16A>G, c.1000-22C>T). Zeevi y colaboradores (163) encontraron alteración en la expresión del RNA en los varones portadores de variantes intrónicas respecto a controles sanos varones, pero no así en mujeres portadoras de variantes intrónicas comparadas controles sanos femeninos. Así mismo detectaron mayor afectación en la expresión de RNA en los sujetos portadores del haplotipo c.-10C>T, c.370-81_370-77del, c.640-16A>G, c.1000-22C>T comparado con un haplotipo similar pero que no incluye la variante c.370-81_370-77del hipotetizando sobre la importancia de dicha variante o si el hecho de ser portadores de un mayor número de variantes implicaría un mayor efecto epigenético sobre la expresión génica y con ello una mayor probabilidad de desarrollar sintomatología. En este mismo artículo describen una mujer de 39 años con ACV portadora de 2 variantes en secuencias intrónicas (640-16A>G y c.1000-22C>T) por lo que la posibilidad del efecto sumatorio de varias variantes queda en entredicho ya que existen otras

mujeres portadoras de 4 variantes en secuencias intrónicas mucho menos sintomáticas.

En nuestro estudio la transcripción del gen *GLA* parece estar disminuida en varios de los sujetos estudiados portadores de variantes intrónicas, aunque esto no parece tener relación con el número de variantes presentes y analizando los resultados en conjunto esta disminución parece ser significativa sólo en el caso de las mujeres ($p=0.02$). Llamamos la atención los sujetos 6 y 7 de los casos, ambas mujeres, que presentan respectivamente haplotipos de 4 y 3 variantes intrónicas, valores de Lyso-Gb3 en el límite de lo normal y reducción de transcritos, especialmente evidente para el sujeto 7. A nivel clínico este último paciente no presenta síntomas evidentes, aunque su padre ha desarrollado arritmia cardíaca a la edad de 40 años, mientras que el sujeto 6 solo ha presentado crisis febriles típicas a los 12 y 30 meses. Por otro lado, la presencia de la variante c.370-81_370-77del no parece estar en relación con la disminución en los transcritos ya que dicha variante está incluida en todos los haplotipos de los sujetos portadores de variantes en secuencias intrónicas estudiados y no todos presentan disminución de transcritos.

La variante c.370-81_370-77del está presente en el 10% de la población (163) al igual que la variante c.640-16A>G. Prevalencias mayores se han sido descritas en relación a la variante c.1000-22C>T, entre 30-25% según los estudios (163,187). En nuestra serie todos los sujetos portadores de variantes en secuencias intrónicas presentan las variantes c.370-81_370-77del y c.1000-22C>T. Se ha sugerido que las variantes c.370-81_370-77del y c.640-16A>G puedan producir cambios en el *splicing* del *GLA* con la consecuente alteración en el patrón de *splicing* habitual (204). Gal (223) y Shabber (187) consideran a las variantes 640-16A>G y c.1000-22C>T como polimorfismos sin considerar asociación con el desarrollo de EF. Sin embargo, Zeevi (163) sí que describe a un mujer de 39 años con EF que presenta ACV portadora de dichas variantes.

Las variantes localizadas en la región promotora son unas de las más frecuentes descritas. Ferreira y colaboradores (224) sugieren que tanto la variante g.5051C>T/c.-10C>T como las variantes g.1150G>A/-30G>A, g.5049G>A/c.-12G>A todas ellas localizadas en la región

5'UTR (*5'-untranslated region*) producen alteraciones en la transcripción en los estudios realizados in vitro, hipotetizando sobre su papel modulador en la expresión del gen *GLA*. Oliveira y colaboradores (188) afirman que la variante c.-10C>T disminuye la actividad enzimática de α -GalA, la variante c.-12G>A no modifica dicha actividad enzimática mientras que la variante -30G>A potencia la actividad enzimática plasmática. La variante c.-10C>T al producir la sustitución C>T provoca una disminución de la capacidad de unión de la proteína (204).

En el estudio de cribado realizado por Bono y colaboradores (220) en 740 sujetos con sintomatología compatible con EF detectaron que el 12 % presentaba variantes en la región promotora del gen *GLA*. 8 de nuestros sujetos (66%), son portadores de la variante c.-10C>T y sólo uno es portador de la variante c.-12G>A (ver Tabla 23). Se ha descrito la presencia de la variante c.-10C>T en el 7% de la población caucásica (225) y otros autores describen similares prevalencias población sana sin especificar la etnia (163). En 2017 Trachoo y colaboradores (145) objetivaron la alta prevalencia de dicha variante en la población Tailandesa encontrada hasta en el 10 % de una muestra de 202 pacientes sanos con actividades α -galactosidasa normal.

La variante c.-10C>T del gen *GLA* se cosegrega con elevada frecuencia con otras variantes intrónicas. En una reciente revisión realizada por Oder y Cols (173) publicada en 2018 sobre sujetos portadores de la variante c.-10C>T detectaron la frecuente cosegregación con otras variantes intrónicas, de los 13 pacientes descritos en ese estudio, 10 presentaban el haplotipo intrónico combinado c.-10C>T, c.640-16>G, c.1000-22C>T, y solo en un paciente se encontraba la variante c.-10C>T no cosegregada con otras variantes. En nuestra serie de pacientes no encontramos ningún paciente con dicha variante de forma aislada.

Ninguno de los sujetos de nuestro estudio portador de esta variante presenta sintomatología clínica compatible con EF ni acúmulo de LysoGb3. En un estudio observacional realizado en 2014 (166) se han descrito incidencias estimadas de 1:11500 portadores sintomáticos de la variante c.-10C>T entre todos los portadores de dicha variante. La afectación clínica descrita provocada por esta variante está en relación

a clínica neurológica (ACV, AIT, lesiones sustancia blanca, dolor neuropático...) si bien se postula que pueda ser necesario algún otro factor neurológico para producir dichas manifestaciones clínicas (166). Oder y Cols (173) describieron que los sujetos heterocigotos (mujeres) portadores de esta variante no presentaban manifestaciones clínicas compatibles con EF pero aquellos sujetos homocigotos (varones) sí que presentaban síntomas compatibles con EF variante tardía por lo que postulan el posible papel de determinadas variantes en secuencias intrónicas gen *GLA* como modificadores genéticos en pacientes homocigotos. Esto podría explicar también la variabilidad clínica intrafamiliar. Sin embargo Trachoo y colaboradores (145) proponen que la variante c.-10C>T es benigna y no susceptible de producir nefropatía.

Oliveira y colaboradores (189) también señalaron la posibilidad de que la variante c.-10C>T estuviese involucrada en la represión o atenuación de la transcripción. Schelleckes y colaboradores (166) demostraron la relación entre la variante intrónica c.-10C>T y la reducción en la expresión de RNA de hasta un 30 % comparado con sujetos sanos excluyendo la participación en dicha reducción de las otras variantes intrónicas frecuentemente cosegregadas (c.640-16A>G y c.1000-22C>T). También objetivaron que dicha reducción es dosis dependiente, y en aquellos pacientes homocigotos la reducción es significativamente mayor comparando con pacientes heterocigotos. En nuestro estudio hemos encontrado disminución en la transcripción en varios sujetos portadores de la variante g c.-10C>T pero también hemos detectado dicha disminución en la transcripción en el sujeto 11 que no es portador de la variante c.-10C>T y en el que sólo se han detectado las variantes c.640-16A>G y c.370-81_370-77del y c.1000-22C>T poniendo de manifiesto las posible relación en la disminución de la transcripción con otras variantes intrónicas. Este sujeto presenta unos valores de Lyso-Gb3 de 3,7 ng/mL y tiene antecedentes familiares en ambas ramas familiares de patología cardíaca.

Gervas y colaboradores (204) hipotetizan sobre el papel de la variante c.-10C>T como modificador epigenético en el control de la expresión génica debido a su situación en una isla CpG en la que la metilación juega un papel a la hora de inhibir la transcripción. También

Zeevi y colaboradores (163) relacionaron la patogenicidad de determinados haplotipos complejos con alteraciones en la metilación de las islas CpG. En nuestros pacientes no se han encontrado diferencias en la metilación entre el grupo portador de variantes *GLA* en la región promotora y el grupo control, sólo se ha encontrado la diferencia entre sexos, relacionables con la lionización del cromosoma X. De todas formas, el número de clones que analizamos es bajo para excluir del todo la presencia de alteraciones en el entorno del promotor. Sin embargo, sí se ha demostrado una alteración en la metilación de un dinucleótido CpG en los sujetos portadores de la variante p.(Ala143Thr), que conlleva la pérdida de un sitio de metilación en estos pacientes, aun no habiéndose evidenciado otras alteraciones en el patrón de metilación del entorno del sitio afectado por la mutación. Esta variación puede estar asociada a la alteración de la expresión del gen *GLA*.

La recomendación realizada sobre el inicio de TES en los pacientes homocigotos portadores de variantes intrónicas en el gen *GLA* es cautelosa y siempre de forma individualizada (173). Schelleckes y colaboradores (166) recomiendan iniciar TES en aquellos pacientes portadores de la variante c.-10C>T con afectación neuropática en los que el tratamiento farmacológico para dicho dolor neuropático no haya sido eficaz así como valorar el inicio de TES en pacientes con lesiones en la sustancia blanca en las que se observe progresión.

En nuestro estudio podemos afirmar que determinadas GVUS del gen *GLA* analizadas presentan una disminución de transcritos comparando con pacientes sanos, lo que podría explicar la baja actividad enzimática encontrada en todos los sujetos sin que se haya demostrado una disminución en la cantidad de proteína, aunque sí acúmulo de LysoGb3 en algunos de ellos. No existen diferencias en la metilación del promotor de *GLA* entre sujetos casos y controles. Clínicamente ninguno de nuestros pacientes presenta sintomatología sugestiva de EF ni tampoco los familiares estudiados. Sin embargo, se debe realizar un adecuado seguimiento clínico de algunos de estos pacientes con el fin de excluir de manera precisa en edades posteriores la presencia de alteraciones clínicas compatibles con EF con el fin de revalorar e iniciar, de ser el caso, terapia enzimática sustitutiva

(concretamente los sujetos 2 y 8 ambos portadores de la variante p.(Ala143Thr) ya que ambos pacientes presentan aumento de LysoGb3, reducción de transcritos y alteración en el patrón de metilación, y los sujetos 7 y 11 portadores de haplotipos complejos de variantes intrónicas que presentan valores de LsyoGb3 en los límites altos de la normalidad y reducción de transcritos). En la Figura 24 se describe la secuencia diagnóstica en un programa de cribado de EF en relación a los hallazgos de GVUS en sujetos clínicamente asintomáticos. De inicio se propone la utilización de la medición de la actividad enzimática en los varones y en aquellos con actividades $< 2 \mu\text{mol/Lh}$ realizar la secuenciación del gen *GLA*. En las mujeres se recomienda iniciar el cribado mediante la secuenciación del gen *GLA* para evitar posibles falsos negativos. En aquellos sujetos en los que se objetiven variantes de significado incierto se debe continuar el estudio realizando análisis de transcritos y medición de LysoGb3. Si encontramos datos sugestivos de EF (aumento de LysoGb3 y disminución de RNA) se realizará una secuenciación completa de *GLA* y si no se objetiva ninguna otra variante patogénica se realizará un seguimiento clínico estrecho así como determinaciones seriadas de LysoGb3 con objeto de vigilar la aparición de sintomatología clínica sugestiva de EF y acúmulo de LysoGb3, lo cual aumentaría la sospecha de EF y promovería la realización de un estudio anatomopatológico (análisis ultraestructural e inmunohistoquímico). En este caso, para analizar el acúmulo de Gb3 se podría llevar a cabo una biopsia de piel debido a la posibilidad de estudio de múltiples tejidos (fibroblastos, sistema nervioso, músculo liso y/o glándulas ecrinas) unido a que constituye un procedimiento menos invasivo comparado con la toma de otro tipo de muestras (renales/cardiacas). Se puede valorar la realización del estudio anatomopatológico a nivel renal o cardiaco en función de las manifestaciones clínicas observadas en el sujeto a estudio o si se obtiene un resultado dudoso mediante el análisis de la muestra cutánea. En el caso de no detectar depósitos de Gb3 a nivel tisular se considerará a dicha variante como probablemente benigna. Si por el contrario se detectan depósitos de Gb3 en la muestra tisular estudiada se podrá considerar a dicha variante como muy probablemente patogénica e

incluir a dicho sujetos en protocolos específicos de seguimiento de EF e iniciar terapia enzimática sustitutiva.



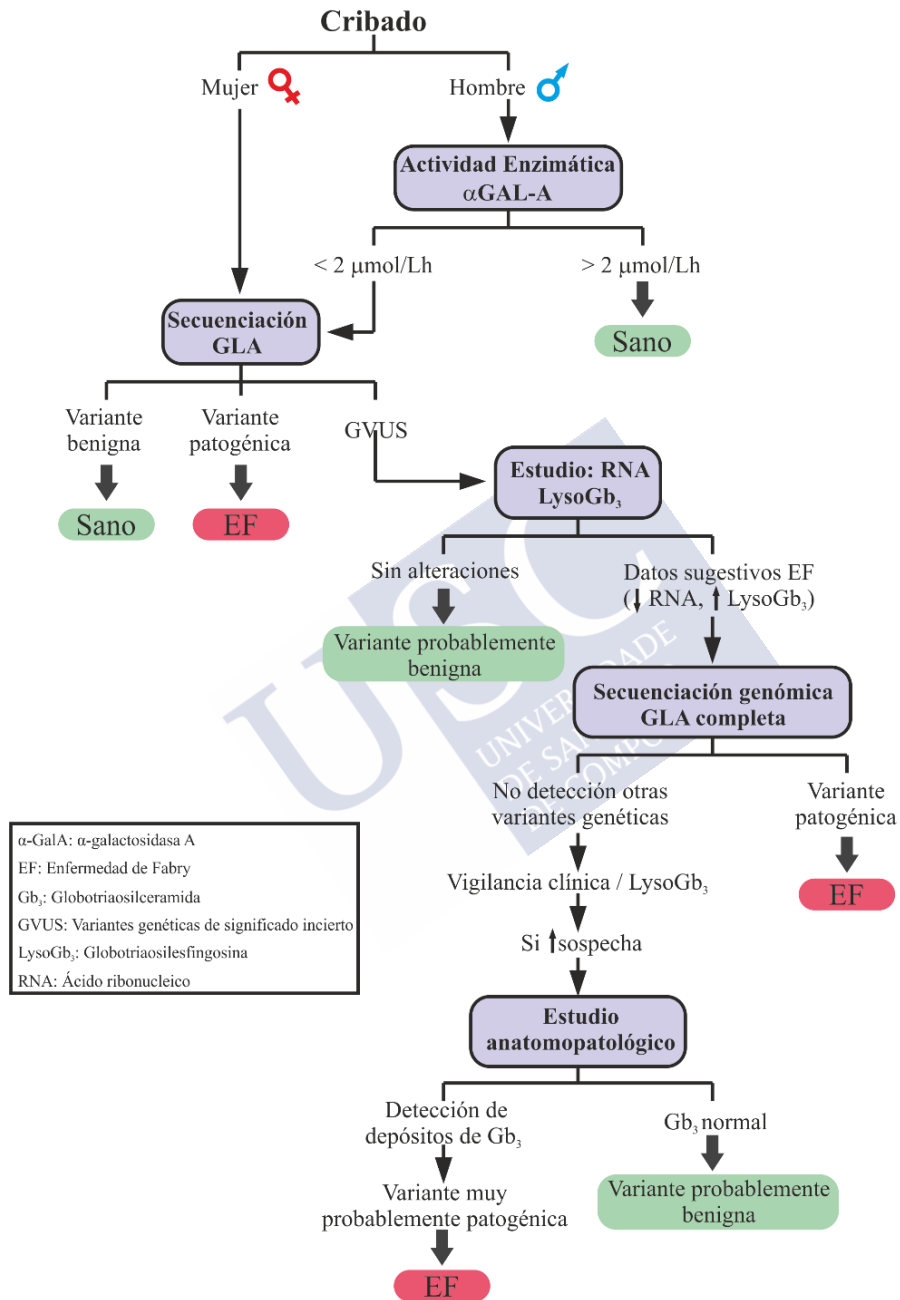


Figura 24. Secuencia Diagnóstica GVUS



7

Conclusiones



7 Conclusiones

1. La prevalencia del fenotipo clásico de EF en varones en Galicia es de 0.013%.
2. Estos datos junto con la viabilidad y la eficacia del método propuesto (Precisión 99.12 % y VPP 1.47%) postulan a la EF como candidata para formar parte de los programas de cribado neonatal sistemáticos.
3. Las GVUS en *GLA* no están generalmente asociadas con el fenotipo de la EF, aunque en casos puntuales se detectan alteraciones en la expresión del gen (Disminución en la transcripción).
4. El seguimiento clínico de los sujetos con GVUS es importante para discriminar entre individuos con variantes benignas e individuos con predisposición a expresar un fenotipo clínico por efecto de modificadores genéticos todavía desconocidos.
5. Se ha realizado un árbol de decisión en la secuencia diagnóstica de un paciente asintomático portador de GVUS.





8

Líneas Futuras



8 Líneas Futuras

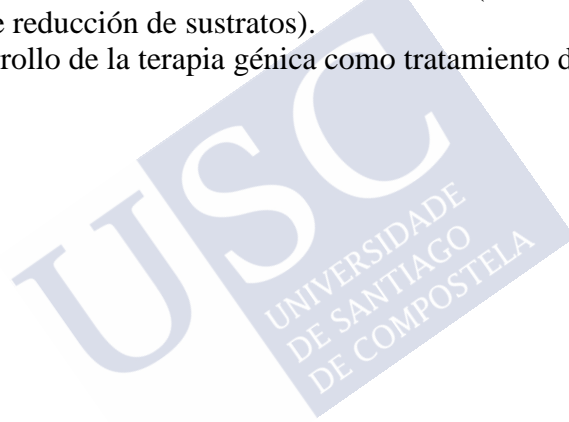
Desarrollo de biomarcadores específicos, fiables y de fácil determinación.

Aproximación fenotipo-genotipo.

Papel de la terapia inmunomoduladora (como mecanismo etiopatogénico y en relación al desarrollo de anticuerpos asociados al uso de TES).

Utilización de tratamientos combinados (TES + Chaperonas + Terapia de reducción de sustratos).

Desarrollo de la terapia génica como tratamiento definitivo.







Bibliografía





Bibliografía

1. Mehta A, Hughes DA. GeneReviews. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJ, Stephens K, et al., editors. University of Washington, Seattle. 1993-2019.; p. 1–54.
2. Hsu T-R, Niu D-M. Fabry disease: Review and experience during newborn screening. *Trends in cardiovascular medicine*. 2018 May;28(4):274–281.
3. Tuttolomondo A, Pecoraro R, Simonetta I, Miceli S, Pinto A, Licata G. Anderson-Fabry disease: a multiorgan disease. *Current pharmaceutical design*. 2013;19(33):5974–5996.
4. Torra R, Ballarín J. [The Fabry's disease]. *Nefrología: publicación oficial de la Sociedad Española Nefrología*. 2003;23 Suppl 1:84–89.
5. Camargo JP CJ. Enfermedad de Fabry. Una perspectiva histórica desde la semiología dermatológica hasta la correlación genética. *Acta Med Colomb*. 2009;34:140–151.
6. J F. Ein Beitrag Zur Kenntnis der Purpura haemorrhagica nodularis. *Arch Dermatol Syphilis*. 1898;47:187–200.
7. WA A. A case of angioqueratoma. *Br J Dermatol*. 1898;10(113-117).
8. Pompem AWM, Ruiters M, Wyers HJG. Angiokeratoma corporis diffusum (universale) Fabry, as a sign of an unknown internal disease; two autopsy reports. *Acta medica Scandinavica*. 1947 Jun;128(3):234–255.
9. Hornbostel H, Scriba K. [Excision of skin in diagnosis of Fabry's angiokeratoma with cardio-vasorenal syndrome as phosphatide storage disease]. *Klinische Wochenschrift*. 1953 Jan;31(3-4):68–69.
10. Sweeley CC, Klionsky B. Fabry's disease: classification as a sphingolipidosis and partial characterization of a novel glycolipid. *The Journal of biological chemistry*. 1963 Sep;238:3148–3150.
11. Opitz JM, Stiles FC, Wise D, Race RR, Sanger R, Von Gemmingen GR, et al. The Genetics of Angiokeratoma Corporis

- Diffusum (Fabry's Disease) and Its Linkage Relations with the Xg Locus. *American journal of human genetics*. 1965 Jul;17(4):325–342.
12. Brady RO, Gal AE, Bradley RM, Martensson E, Warshaw AL, Laster L. Enzymatic defect in Fabry's disease. Ceramidetrihexosidase deficiency. *The New England journal of medicine*. 1967 May;276(21):1163–1167.
 13. Mapes CA SC et al. Anderson RL. Enzyme replacement in Fabry's disease, an inborn error of metabolism. *Science*. 1970;169 (949):987–989.
 14. Brady RO, Tallman JF, Johnson WG, Gal AE, Leahy WR, Quirk JM, et al. Replacement therapy for inherited enzyme deficiency. Use of purified ceramidetrihexosidase in Fabry's disease. *The New England journal of medicine*. 1973 Jul;289(1):9–14.
 15. Kornreich R, Bishop DF, Desnick RJ. The gene encoding alpha-galactosidase A and gene rearrangements causing Fabry disease. *Transactions of the Association of American Physicians*. 1989;102:30–43.
 16. Rozenfeld P, Neumann PM. Treatment of fabry disease: current and emerging strategies. *Current pharmaceutical biotechnology*. 2011 Jun;12(6):916–922.
 17. Jung SC, Han IP, Limaye A, Xu R, Gelderman MP, Zerfas P, et al. Adeno-associated viral vector-mediated gene transfer results in long-term enzymatic and functional correction in multiple organs of Fabry mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001 Feb;98(5):2676–2681.
 18. Takahashi H, Hirai Y, Migita M, Seino Y, Fukuda Y, Sakuraba H, et al. Long-term systemic therapy of Fabry disease in a knockout mouse by adeno-associated virus-mediated muscle-directed gene transfer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002 Oct;99(21):13777–13782.
 19. Takenaka T, Murray GJ, Qin G, Quirk JM, Ohshima T, Qasba P, et al. Long-term enzyme correction and lipid reduction in multiple organs of primary and secondary transplanted Fabry

- mice receiving transduced bone marrow cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2000 Jun;97(13):7515–7520.
20. Li C, Ziegler RJ, Cherry M, Lukason M, Desnick RJ, Yew NS, et al. Adenovirus-transduced lung as a portal for delivering alpha-galactosidase A into systemic circulation for Fabry disease. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*. 2002 Jun;5(6):745–754.
 21. Ziegler RJ, Cherry M, Barbon CM, Li C, Bercury SD, Armentano D, et al. Correction of the biochemical and functional deficits in fabry mice following AAV8-mediated hepatic expression of alpha-galactosidase A. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*. 2007 Mar;15(3):492–500.
 22. Romano G. Development of safer gene delivery systems to minimize the risk of insertional mutagenesis-related malignancies: a critical issue for the field of gene therapy. *ISRN oncology*. 2012;2012:616310.
 23. Guérard N, Oder D, Nordbeck P, Zwingelstein C, Morand O, Welford RWD, et al. Lucerastat, an Iminosugar for Substrate Reduction Therapy: Tolerability, Pharmacodynamics, and Pharmacokinetics in Patients With Fabry Disease on Enzyme Replacement. *Clinical pharmacology and therapeutics*. 2018 Apr;103(4):703–711.
 24. McCafferty EH, Scott LJ. Migalastat: A Review in Fabry Disease. *Drugs*. 2019 Mar;
 25. Topaloglu AK, Ashley GA, Tong B, Shabbeer J, Astrin KH, Eng CM, et al. Twenty novel mutations in the alpha-galactosidase A gene causing Fabry disease. *Molecular medicine (Cambridge, Mass.)*. 1999 Dec;5(12):806–811.
 26. Schiffmann R, Ries M. Fabry Disease: A Disorder of Childhood Onset. *Pediatric neurology*. 2016 Nov;64:10–20.
 27. Thomas AS, Hughes DA. Fabry disease. *Pediatric endocrinology reviews : PER*. 2014 Sep;12 Suppl 1:88–101.
 28. Vega-Vega O, Pérez-Gutiérrez A, Correa-Rotter R. [Fabry-Anderson disease: current state of knowledge]. *Revista de*

- investigacion clinica; organo del Hospital de Enfermedades de la Nutricion. 2011;63(3):314–321.
29. <http://www.hgmd.cf.ac.uk>. The Human Gene Mutation Database (HGMD). Accedido 07/04/2019.
 30. Ishii S, Chang H-H, Kawasaki K, Yasuda K, Wu H-L, Garman SC, et al. Mutant alpha-galactosidase A enzymes identified in Fabry disease patients with residual enzyme activity: biochemical characterization and restoration of normal intracellular processing by 1-deoxygalactonojirimycin. *The Biochemical journal*. 2007 Sep;406(2):285–295.
 31. Wang S, Kaufman RJ. The impact of the unfolded protein response on human disease. *The Journal of cell biology*. 2012 Jun;197(7):857–867.
 32. Ortiz A, Sanchez-Niño MD. Diagnosis and treatment of Fabry disease. *Medicina clinica*. 2017 Feb;148(3):132–138.
 33. Elleder M, Bradová V, Smíd F, Buděšínský M, Harzer K, Kustermann-Kuhn B, et al. Cardiocyte storage and hypertrophy as a sole manifestation of Fabry's disease. Report on a case simulating hypertrophic non-obstructive cardiomyopathy. *Virchows Archiv. A, Pathological anatomy and histopathology*. 1990;417(5):449–455.
 34. Shen J-S, Meng X-L, Moore DF, Quirk JM, Shayman JA, Schiffmann R, et al. Globotriaosylceramide induces oxidative stress and up-regulates cell adhesion molecule expression in Fabry disease endothelial cells. *Molecular genetics and metabolism*. 2008 Nov;95(3):163–168.
 35. Lücke T, Höppner W, Schmidt E, Illsinger S, Das AM. Fabry disease: reduced activities of respiratory chain enzymes with decreased levels of energy-rich phosphates in fibroblasts. *Molecular genetics and metabolism*. 2004 May;82(1):93–97.
 36. Aerts JM, Groener JE, Kuiper S, Donker-Koopman WE, Strijland A, Ottenhoff R, et al. Elevated globotriaosylsphingosine is a hallmark of Fabry disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008 Feb;105(8):2812–2817.

37. Sanchez-Niño MD, Sanz AB, Carrasco S, Saleem MA, Mathieson PW, Valdivielso JM, et al. Globotriaosylsphingosine actions on human glomerular podocytes: implications for Fabry nephropathy. *Nephrology, dialysis, transplantation: official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*. 2011 Jun;26(6):1797–1802.
38. Sanchez-Niño MD, Carpio D, Sanz AB, Ruiz-Ortega M, Mezzano S, Ortiz A. Lyso-Gb3 activates Notch1 in human podocytes. *Human molecular genetics*. 2015 Oct;24(20):5720–5732.
39. Meikle PJ, Hopwood JJ, Clague AE, Carey WF. Prevalence of lysosomal storage disorders. *JAMA*. 1999 Jan;281(3):249–254.
40. Scott CR, Elliott S, Buroker N, Thomas LI, Keutzer J, Glass M, et al. Identification of infants at risk for developing Fabry, Pompe, or mucopolysaccharidosis-I from newborn blood spots by tandem mass spectrometry. *The Journal of pediatrics*. 2013 Aug;163(2):498–503.
41. Hopkins PV, Campbell C, Klug T, Rogers S, Raburn-Miller J, Kiesling J. Lysosomal storage disorder screening implementation: findings from the first six months of full population pilot testing in Missouri. *The Journal of pediatrics*. 2015 Jan;166(1):172–177.
42. Monserrat L, Gimeno-Blanes JR, Marín F, Hermida-Prieto M, García-Honrubia A, Pérez I, et al. Prevalence of fabry disease in a cohort of 508 unrelated patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Journal of the American College of Cardiology*. 2007 Dec;50(25):2399–2403.
43. Kubo T, Ochi Y, Baba Y, Hirota T, Tanioka K, Yamasaki N, et al. Prevalence and clinical features of Fabry disease in Japanese male patients with diagnosis of hypertrophic cardiomyopathy. *Journal of cardiology*. 2017 Jan;69(1):302–307.
44. Serebrinsky G, Calvo M, Fernandez S, Saito S, Ohno K, Wallace E, et al. Late onset variants in Fabry disease: Results in high risk population screenings in Argentina. *Molecular genetics and metabolism reports*. 2015 Sep;4:19–24.

45. Desnick RJ, EC Ioannou YA. The metabolic and molecular basis of inherited disease. 8th ed. McGraw-Hill, editor. New York; 2001.
46. Germain DP. Fabry disease. Orphanet journal of rare diseases. 2010 Nov;5:30.
47. Silva LBN da, Badiz TC de MT, Enokihara MMS e S, Porro AM. Fabry disease: clinical and genotypic aspects of three cases in first degree relatives. Anais brasileiros de dermatologia. 2014;89(1):141–143.
48. Vedder AC, Linthorst GE, Breemen MJ van, Groener JEM, Bemelman FJ, Strijland A, et al. The Dutch Fabry cohort: diversity of clinical manifestations and Gb3 levels. Journal of inherited metabolic disease. 2007 Feb;30(1):68–78.
49. GADYTEF C de Médicos de AADELFA y, Neumann P, Antongiovanni N, Fainboim A, Kisinovsky I, Amartino H, et al. [Guidelines for diagnosis, monitoring and treatment of Fabry disease]. Medicina. 2013;73(5):482–494.
50. El-Abassi R, Singhal D, England JD. Fabry's disease. Journal of the neurological sciences. 2014 Sep;344(1-2):5–19.
51. Linhart A, Palecek T, Bultas J, Ferguson JJ, Hrudová J, Karetová D, et al. New insights in cardiac structural changes in patients with Fabry's disease. American heart journal. 2000 Jun;139(6):1101–1108.
52. Ramaswami U, Whybra C, Parini R, Pintos-Morell G, Mehta A, Sunder-Plassmann G, et al. Clinical manifestations of Fabry disease in children: data from the Fabry Outcome Survey. Acta paediatrica (Oslo, Norway : 1992). 2006 Jan;95(1):86–92.
53. Schiffmann R, Scott LJC. Pathophysiology and assessment of neuropathic pain in Fabry disease. Acta paediatrica (Oslo, Norway : 1992). Supplement. 2002;91(439):48–52.
54. MacDermot J, MacDermot KD. Neuropathic pain in Anderson-Fabry disease: pathology and therapeutic options. European journal of pharmacology. 2001 Oct;429(1-3):121–125.
55. Donaghy M, Hakin RN, Bamford JM, Garner A, Kirkby GR, Noble BA, et al. Hereditary sensory neuropathy with neurotrophic keratitis. Description of an autosomal recessive

- disorder with a selective reduction of small myelinated nerve fibres and a discussion of the classification of the hereditary sensory neuropathies. *Brain: a journal of neurology*. 1987 Jun;110 (Pt 3):563–583.
56. Lidove O, Ramaswami U, Jaussaud R, Barbey F, Maisonobe T, Caillaud C, et al. Hyperhidrosis: a new and often early symptom in Fabry disease. International experience and data from the Fabry Outcome Survey. *International journal of clinical practice*. 2006 Sep;60(9):1053–1059.
 57. Cable WJ, Kolodny EH, Adams RD. Fabry disease: impaired autonomic function. *Neurology*. 1982 May;32(5):498–502.
 58. Ries M, Clarke JTR, Whybra C, Timmons M, Robinson C, Schlaggar BL, et al. Enzyme-replacement therapy with agalsidase alfa in children with Fabry disease. *Pediatrics*. 2006 Sep;118(3):924–932.
 59. Sims K, Politei J, Banikazemi M, Lee P. Stroke in Fabry disease frequently occurs before diagnosis and in the absence of other clinical events: natural history data from the Fabry Registry. *Stroke*. 2009 Mar;40(3):788–794.
 60. Patel MR, Cecchi F, Cizmarik M, Kantola I, Linhart A, Nicholls K, et al. Cardiovascular events in patients with fabry disease natural history data from the fabry registry. *Journal of the American College of Cardiology*. 2011 Mar;57(9):1093–1099.
 61. Rolfs A, Böttcher T, Zschesche M, Morris P, Winchester B, Bauer P, et al. Prevalence of Fabry disease in patients with cryptogenic stroke: a prospective study. *Lancet (London, England)*. 2005 Nov;366(9499):1794–1796.
 62. Testai FD, Gorelick PB. Inherited metabolic disorders and stroke part 1: Fabry disease and mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and strokelike episodes. *Archives of neurology*. 2010 Jan;67(1):19–24.
 63. Rombach SM, Twickler TB, Aerts JMFG, Linthorst GE, Wijburg FA, Hollak CEM. Vasculopathy in patients with Fabry disease: current controversies and research directions. *Molecular genetics and metabolism*. 2010 Feb;99(2):99–108.

64. Fellgiebel A, Müller MJ, Ginsberg L. CNS manifestations of Fabry's disease. *The Lancet. Neurology*. 2006 Sep;5(9):791–795.
65. Fellgiebel A, Keller I, Marin D, Müller MJ, Schermuly I, Yakushev I, et al. Diagnostic utility of different MRI and MR angiography measures in Fabry disease. *Neurology*. 2009 Jan;72(1):63–68.
66. Moore DF, Altarescu G, Ling GSF, Jeffries N, Frei KP, Weibel T, et al. Elevated cerebral blood flow velocities in Fabry disease with reversal after enzyme replacement. *Stroke*. 2002 Feb;33(2):525–531.
67. Jardim L, Vedolin L, Schwartz IVD, Burin MG, Cecchin C, Kalakun L, et al. CNS involvement in Fabry disease: clinical and imaging studies before and after 12 months of enzyme replacement therapy. *Journal of inherited metabolic disease*. 2004;27(2):229–240.
68. Laney DA, Peck DS, Atherton AM, Manwaring LP, Christensen KM, Shankar SP, et al. Fabry disease in infancy and early childhood: a systematic literature review. *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics*. 2015 May;17(5):323–330.
69. Burlina AP, Politei J, Cinque S, Soliani A, Carlier RY, Germain DP, et al. The pulvinal sign in Fabry patients: the first report in female patients. *Journal of neurology*. 2012 Jun;259(6):1227–1228.
70. Moore DF, Ye F, Schiffmann R, Butman JA. Increased signal intensity in the pulvinal on T1-weighted images: a pathognomonic MR imaging sign of Fabry disease. *AJNR. American journal of neuroradiology*. 2003;24(6):1096–1101.
71. Takanashi J, Barkovich AJ, Dillon WP, Sherr EH, Hart KA, Packman S. T1 hyperintensity in the pulvinal: key imaging feature for diagnosis of Fabry disease. *AJNR. American journal of neuroradiology*. 2003 May;24(5):916–921.
72. Buechner S, Moretti M, Burlina AP, Cei G, Manara R, Ricci R, et al. Central nervous system involvement in Anderson-Fabry disease: a clinical and MRI retrospective study. *Journal of*

- neurology, neurosurgery, and psychiatry. 2008 Nov;79(11):1249–1254.
73. Germain DP, Benistan K, Halimi P. Chiari type I malformation in four unrelated patients affected with Fabry disease. *European journal of medical genetics*. 2006;49(5):419–425.
 74. Zampetti A, Orteu CH, Antuzzi D, Bongiorno MR, Manco S, Gnarra M, et al. Angiokeratoma: decision-making aid for the diagnosis of Fabry disease. *The British journal of dermatology*. 2012 Apr;166(4):712–720.
 75. Sodi A, Ioannidis AS, Mehta A, Davey C, Beck M, Pitz S. Ocular manifestations of Fabry’s disease: data from the Fabry Outcome Survey. *The British journal of ophthalmology*. 2007 Feb;91(2):210–214.
 76. Nguyen TT, Gin T, Nicholls K, Low M, Galanos J, Crawford A. Ophthalmological manifestations of Fabry disease: a survey of patients at the Royal Melbourne Fabry Disease Treatment Centre. *Clinical & experimental ophthalmology*. 2005 Apr;33(2):164–168.
 77. Pitz S, Kalkum G, Arash L, Karabul N, Sodi A, Larroque S, et al. Ocular signs correlate well with disease severity and genotype in Fabry disease. *PloS one*. 2015;10(3):e0120814.
 78. Hoffmann B, Schwarz M, Mehta A, Keshav S, Investigators FOSE. Gastrointestinal symptoms in 342 patients with Fabry disease: prevalence and response to enzyme replacement therapy. *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association*. 2007 Dec;5(12):1447–1453.
 79. Ali N, Gillespie S, Laney D. Treatment of Depression in Adults with Fabry Disease. *JIMD reports*. 2018;38:13–21.
 80. Loeb J, Feldt-Rasmussen U, Madsen CV, Vogel A. Cognitive Impairments and Subjective Cognitive Complaints in Fabry Disease: A Nationwide Study and Review of the Literature. *JIMD reports*. 2018 Apr;
 81. Keilmann A, Hajioff D, Ramaswami U, Investigators F. Ear symptoms in children with Fabry disease: data from the Fabry

- Outcome Survey. *Journal of inherited metabolic disease*. 2009 Dec;32(6):739.
82. Palla A, Hegemann S, Widmer U, Straumann D. Vestibular and auditory deficits in Fabry disease and their response to enzyme replacement therapy. *Journal of neurology*. 2007 Oct;254(10):1433–1442.
83. Ries M, Kim HJ, Zalewski CK, Mastroianni MA, Moore DF, Brady RO, et al. Neuropathic and cerebrovascular correlates of hearing loss in Fabry disease. *Brain: a journal of neurology*. 2007 Jan;130(Pt 1):143–150.
84. Faggiano A, Pisani A, Milone F, Gaccione M, Filippella M, Santoro A, et al. Endocrine dysfunction in patients with Fabry disease. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2006 Nov;91(11):4319–4325.
85. Magage S, Lubanda J-C, Susa Z, Bultas J, Karetová D, Dobrovolný R, et al. Natural history of the respiratory involvement in Anderson-Fabry disease. *Journal of inherited metabolic disease*. 2007 Oct;30(5):790–799.
86. Odler B, Cseh Á, Constantin T, Fekete G, Losonczy G, Tamási L, et al. Long time enzyme replacement therapy stabilizes obstructive lung disease and alters peripheral immune cell subsets in Fabry patients. *The clinical respiratory journal*. 2017 Nov;11(6):942–950.
87. Germain DP, Benistan K, Boutouyrie P, Mutschler C. Osteopenia and osteoporosis: previously unrecognized manifestations of Fabry disease. *Clinical genetics*. 2005 Jul;68(1):93–95.
88. Cabrera-Salazar MA, O'Rourke E, Charria-Ortiz G, Barranger JA. Radiological evidence of early cerebral microvascular disease in young children with Fabry disease. *The Journal of pediatrics*. 2005 Jul;147(1):102–105.
89. Breathnach SM, Black MM, Wallace HJ. Anderson-Fabry disease. Characteristic ultrastructural features in cutaneous blood vessels in a 1-year-old boy. *The British journal of dermatology*. 1980 Jul;103(1):81–84.

90. Ries M, Ramaswami U, Parini R, Lindblad B, Whybra C, Willers I, et al. The early clinical phenotype of Fabry disease: a study on 35 European children and adolescents. *European journal of pediatrics*. 2003 Nov;162(11):767–772.
91. Havranek S, Linhart A, Urbanova Z, Ramaswami U. Early cardiac changes in children with anderson-fabry disease. *JIMD reports*. 2013;11:53–64.
92. Kampmann C, Wiethoff CM, Whybra C, Baehner FA, Mengel E, Beck M. Cardiac manifestations of Anderson-Fabry disease in children and adolescents. *Acta paediatrica (Oslo, Norway : 1992)*. 2008 Apr;97(4):463–469.
93. Najafian B, Svarstad E, Bostad L, Gubler M-C, Tøndel C, Whitley C, et al. Progressive podocyte injury and globotriaosylceramide (GL-3) accumulation in young patients with Fabry disease. *Kidney international*. 2011 Mar;79(6):663–670.
94. Hopkin RJ, Bissler J, Banikazemi M, Clarke L, Eng CM, Germain DP, et al. Characterization of Fabry disease in 352 pediatric patients in the Fabry Registry. *Pediatric research*. 2008 Nov;64(5):550–555.
95. Ortiz A, Germain DP, Desnick RJ, Politei J, Mauer M, Burlina A, et al. Fabry disease revisited: Management and treatment recommendations for adult patients. *Molecular genetics and metabolism*. 2018 Apr;123(4):416–427.
96. Schiffmann R, Fuller M, Clarke LA, Aerts JMFG. Is it Fabry disease? *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics*. 2016 Dec;18(12):1181–1185.
97. Lu Y-H, Huang P-H, Wang L-Y, Hsu T-R, Li H-Y, Lee P-C, et al. Improvement in the sensitivity of newborn screening for Fabry disease among females through the use of a high-throughput and cost-effective method, DNA mass spectrometry. *Journal of human genetics*. 2018 Jan;63(1):1–8.
98. Young E, Mills K, Morris P, Vellodi A, Lee P, Waldek S, et al. Is globotriaosylceramide a useful biomarker in Fabry disease? *Acta paediatrica (Oslo, Norway : 1992)*. Supplement. 2005 Mar;94(447):51–4; discussion 37–8.

99. Whitfield PD, Calvin J, Hogg S, O'Driscoll E, Halsall D, Burling K, et al. Monitoring enzyme replacement therapy in Fabry disease—role of urine globotriaosylceramide. *Journal of inherited metabolic disease*. 2005;28(1):21–33.
100. Ferreira S, Auray-Blais C, Boutin M, Lavoie P, Nunes JP, Martins E, et al. Variations in the GLA gene correlate with globotriaosylceramide and globotriaosylsphingosine analog levels in urine and plasma. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 2015 Jul;447:96–104.
101. Schiffmann R, Forni S, Swift C, Brignol N, Wu X, Lockhart DJ, et al. Risk of death in heart disease is associated with elevated urinary globotriaosylceramide. *Journal of the American Heart Association*. 2014 Feb;3(1):e000394.
102. Auray-Blais C, Lavoie P, Boutin M, Abaoui M. High-Risk Screening for Fabry Disease: Analysis by Tandem Mass Spectrometry of Globotriaosylceramide (Gb, `javax.xml.bind.JAXBElement@74a752c6`,) in Urine Collected on Filter Paper. *Current protocols in human genetics*. 2017 Apr;93:17.26.1–17.26.12.
103. Barr C, Clarke JTR, Ntwari A, Drouin R, Auray-Blais C. Fabry disease urinary globotriaosylceramide/creatinine biomarker evaluation by liquid chromatography-tandem mass spectrometry in healthy infants from birth to 6 months. *Molecular genetics and metabolism*. 2009 Aug;97(4):278–283.
104. Ouyang Y, Chen B, Pan X, Wang Z, Ren H, Xu Y, et al. Clinical significance of plasma globotriaosylsphingosine levels in Chinese patients with Fabry disease. *Experimental and therapeutic medicine*. 2018 Apr;15(4):3733–3742.
105. Chien Y-H, Bodamer OA, Chiang S-C, Mascher H, Hung C, Hwu W-L. Lyso-globotriaosylsphingosine (lyso-Gb3) levels in neonates and adults with the Fabry disease later-onset GLA IVS4+919G>A mutation. *Journal of inherited metabolic disease*. 2013 Sep;36(5):881–885.
106. Breemen MJ van, Rombach SM, Dekker N, Poorthuis BJ, Linthorst GE, Zwinderman AH, et al. Reduction of elevated plasma globotriaosylsphingosine in patients with classic Fabry

- disease following enzyme replacement therapy. *Biochimica et biophysica acta*. 2011 Jan;1812(1):70–76.
107. Togawa T, Kawashima I, Kodama T, Tsukimura T, Suzuki T, Fukushima T, et al. Tissue and plasma globotriaosylsphingosine could be a biomarker for assessing enzyme replacement therapy for Fabry disease. *Biochemical and biophysical research communications*. 2010 Sep;399(4):716–720.
108. Auray-Blais C, Blais C-M, Ramaswami U, Boutin M, Germain DP, Dyack S, et al. Urinary biomarker investigation in children with Fabry disease using tandem mass spectrometry. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 2015 Jan;438:195–204.
109. Liao H-C, Huang Y-H, Chen Y-J, Kao S-M, Lin H-Y, Huang C-K, et al. Plasma globotriaosylsphingosine (lysoGb3) could be a biomarker for Fabry disease with a Chinese hotspot late-onset mutation (IVS4+919G>A). *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 2013 Nov;426:114–120.
110. Niemann M, Rolfs A, Störk S, Bijnens B, Breunig F, Beer M, et al. Gene mutations versus clinically relevant phenotypes: lyso-Gb3 defines Fabry disease. *Circulation. Cardiovascular genetics*. 2014 Feb;7(1):8–16.
111. Rombach SM, Dekker N, Bouwman MG, Linthorst GE, Zwinderman AH, Wijburg FA, et al. Plasma globotriaosylsphingosine: diagnostic value and relation to clinical manifestations of Fabry disease. *Biochimica et biophysica acta*. 2010 Sep;1802(9):741–748.
112. Maruyama H, Miyata K, Mikame M, Taguchi A, Guili C, Shimura M, et al. Effectiveness of plasma lyso-Gb3 as a biomarker for selecting high-risk patients with Fabry disease from multispecialty clinics for genetic analysis. *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics*. 2019 Jan;21(1):44–52.
113. Beirão I, Cabrita A, Torres M, Silva F, Aguiar P, Laranjeira F, et al. Biomarkers and Imaging Findings of Anderson-Fabry Disease-What We Know Now. *Diseases (Basel, Switzerland)*. 2017 Jun;5(2).

114. Cammarata G, Scalia S, Colomba P, Zizzo C, Pisani A, Riccio E, et al. A pilot study of circulating microRNAs as potential biomarkers of Fabry disease. *Oncotarget*. 2018 Jun;9(44):27333–27345.
115. Gal A, Hughes DA, Winchester B. Toward a consensus in the laboratory diagnostics of Fabry disease - recommendations of a European expert group. *Journal of inherited metabolic disease*. 2011 Apr;34(2):509–514.
116. Calderón Sandubete EJ, Blanca E Briones Pérez de la, Alonso-Ortiz Del Río C, Santamaría Olmo R, López Mendoza M, Barcos Martínez M, et al. Spanish multidisciplinary clinical practice guidelines for Anderson-Fabry Disease in Adults. I. Method and recommendations. *Revista clinica espanola*. 2019 Jan;
117. Wanner C, Arad M, Baron R, Burlina A, Elliott PM, Feldt-Rasmussen U, et al. European expert consensus statement on therapeutic goals in Fabry disease. *Molecular genetics and metabolism*. 2018 Jul;124(3):189–203.
118. <https://clinicaltrials.gov>. Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos (NIH). Accedido 07/04/2019.
119. Tøndel C, Bostad L, Larsen KK, Hirth A, Vikse BE, Houge G, et al. Agalsidase benefits renal histology in young patients with Fabry disease. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2013 Jan;24(1):137–148.
120. Arends M, Biegstraaten M, Wanner C, Sirrs S, Mehta A, Elliott PM, et al. Agalsidase alfa versus agalsidase beta for the treatment of Fabry disease: an international cohort study. *Journal of medical genetics*. 2018 May;55(5):351–358.
121. Wanner C, Germain DP, Hilz MJ, Spada M, Falissard B, Elliott PM. Therapeutic goals in Fabry disease: Recommendations of a European expert panel, based on current clinical evidence with enzyme replacement therapy. *Molecular genetics and metabolism*. 2018 Apr;
122. Eng CM, Guffon N, Wilcox WR, Germain DP, Lee P, Waldek S, et al. Safety and efficacy of recombinant human alpha-

- galactosidase A replacement therapy in Fabry's disease. *The New England journal of medicine*. 2001 Jul;345(1):9–16.
123. Bénichou B, Goyal S, Sung C, Norfleet AM, O'Brien F. A retrospective analysis of the potential impact of IgG antibodies to agalsidase beta on efficacy during enzyme replacement therapy for Fabry disease. *Molecular genetics and metabolism*. 2009 Jan;96(1):4–12.
 124. Cairns T, Müntze J, Gernert J, Spingler L, Nordbeck P, Wanner C. Hot topics in Fabry disease. *Postgraduate medical journal*. 2018 Dec;94(1118):709–713.
 125. Wijburg FA, Bénichou B, Bichet DG, Clarke LA, Dostalova G, Fainboim A, et al. Characterization of early disease status in treatment-naive male paediatric patients with Fabry disease enrolled in a randomized clinical trial. *PloS one*. 2015;10(5):e0124987.
 126. Biegstraaten M, Arngrímsson R, Barbey F, Boks L, Cecchi F, Deegan PB, et al. Recommendations for initiation and cessation of enzyme replacement therapy in patients with Fabry disease: the European Fabry Working Group consensus document. *Orphanet journal of rare diseases*. 2015 Mar;10:36.
 127. Germain DP, Nicholls K, Giugliani R, Bichet DG, Hughes DA, Barisoni LM, et al. Efficacy of the pharmacologic chaperone migalastat in a subset of male patients with the classic phenotype of Fabry disease and migalastat-amenable variants: data from the phase 3 randomized, multicenter, double-blind clinical trial and extension study. *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics*. 2019 Feb;
 128. Clinical Review Report: Migalastat (Galafold): (Amicus Therapeutics): Indication: Fabry Disease. Canadian Agency for Drugs and Technologies in Health; 2018 Feb;
 129. Germain DP, Hughes DA, Nicholls K, Bichet DG, Giugliani R, Wilcox WR, et al. Treatment of Fabry's Disease with the Pharmacologic Chaperone Migalastat. *The New England journal of medicine*. 2016 Aug;375(6):545–555.
 130. Hughes DA, Nicholls K, Shankar SP, Sunder-Plassmann G, Koeller D, Nedd K, et al. Oral pharmacological chaperone

- migalastat compared with enzyme replacement therapy in Fabry disease: 18-month results from the randomised phase III ATTRACT study. *Journal of medical genetics*. 2017 Apr;54(4):288–296.
131. Medin JA, Khan A, Huang J, Barber D, Rupar CA, Auray-Blais C, et al. FACTs Fabry gene therapy clinical trial: Two-year data. *Molecular Genetics and Metabolism*. Elsevier BV; 2019 Feb;126(2):S99.
132. Schiffmann R, Goker-Alpan O, Holida M, Giraldo P, Barisoni L, Colvin RB, et al. Pegunigalsidase alfa, a novel PEGylated enzyme replacement therapy for Fabry disease, provides sustained plasma concentrations and favorable pharmacodynamics: a 1-year Phase 1/2 clinical trial. *Journal of inherited metabolic disease*. 2019 Mar;
133. Hopkin RJ, Jefferies JL, Laney DA, Lawson VH, Mauer M, Taylor MR, et al. The management and treatment of children with Fabry disease: A United States-based perspective. *Molecular genetics and metabolism*. 2016 Feb;117(2):104–113.
134. Spada M, Baron R, Elliott PM, Falissard B, Hilz MJ, Monserrat L, et al. The effect of enzyme replacement therapy on clinical outcomes in paediatric patients with Fabry disease - A systematic literature review by a European panel of experts. *Molecular genetics and metabolism*. 2018 Apr;
135. Gorostidi M, Santamaría R, Alcázar R, Fernández-Fresnedo G, Galcerán JM, Goicoechea M, et al. Spanish Society of Nephrology document on KDIGO guidelines for the assessment and treatment of chronic kidney disease. *Nefrología: publicación oficial de la Sociedad Española Nefrología*. 2014 May;34(3):302–316.
136. Vicente E, Casas L, Ardanaz E. [Origin of newborn screening programs and their beginnings in Spain]. *Anales del sistema sanitario de Navarra*. 2017 Apr;40(1):131–140.
137. GIBBS NK, WOOLF LI. Tests for phenylketonuria: results of a one-year programme for its detection in infancy and among mental defectives. *British medical journal*. 1959 Sep;2(5151):532–535.

138. Elena Dulín-Iñiguez IE-G Mercedes Espada. Programas de cribado neonatal. *An Pediatr Contin.* 2006;4(1):61–5.
139. Wilson JM, Jungner YG. [Principles and practice of mass screening for disease]. *Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana.* Pan American Sanitary Bureau. 1968 Oct;65(4):281–393.
140. Wittmann J, Karg E, Turi S, Legnini E, Wittmann G, Giese A-K, et al. Newborn screening for lysosomal storage disorders in Hungary. *JIMD reports.* 2012;6:117–125.
141. Lisi EC, Gillespie S, Laney D, Ali N. Patients' perspectives on newborn screening for later-onset lysosomal storage diseases. *Molecular genetics and metabolism.* 2016 Sep;119(1-2):109–114.
142. Navarrete-Martínez JI, Limón-Rojas AE, Gaytán-García M de J, Reyna-Figueroa J, Wakida-Kusunoki G, Delgado-Calvillo MDR, et al. Newborn screening for six lysosomal storage disorders in a cohort of Mexican patients: Three-year findings from a screening program in a closed Mexican health system. *Molecular genetics and metabolism.* 2017 May;121(1):16–21.
143. Macklin S, Laney D, Lisi E, Atherton A, Smith E. The Psychosocial Impact of Carrying a Debated Variant in the GLA Gene. *Journal of genetic counseling.* 2018 Feb;27(1):217–224.
144. Doheny D, Srinivasan R, Pagant S, Chen B, Yasuda M, Desnick RJ. Fabry Disease: prevalence of affected males and heterozygotes with pathogenic mutations identified by screening renal, cardiac and stroke clinics, 1995-2017. *Journal of medical genetics.* 2018 Apr;55(4):261–268.
145. Trachoo O, Jittorntam P, Pibalyart S, Kajanachumphol S, Suvachittanont N, Patputthipong S, et al. Screening of Fabry disease in patients with end-stage renal disease of unknown etiology: the first Thailand study. *Journal of biomedical research.* 2016 Oct;31(1):17–24.
146. Tol L van der, Svarstad E, Ortiz A, Tøndel C, Oliveira JP, Vogt L, et al. Chronic kidney disease and an uncertain diagnosis of

- Fabry disease: approach to a correct diagnosis. *Molecular genetics and metabolism*. 2015 Feb;114(2):242–247.
147. Maron MS, Xin W, Sims KB, Butler R, Haas TS, Rowin EJ, et al. Identification of Fabry Disease in a Tertiary Referral Cohort of Patients with Hypertrophic Cardiomyopathy. *The American journal of medicine*. 2018 Feb;131(2):200.e1–200.e8.
 148. Nakao S, Takenaka T, Maeda M, Kodama C, Tanaka A, Tahara M, et al. An atypical variant of Fabry's disease in men with left ventricular hypertrophy. *The New England journal of medicine*. 1995 Aug;333(5):288–293.
 149. Haggège AA, Caudron E, Damy T, Roudaut R, Millaire A, Etchecopar-Chevreuil C, et al. Screening patients with hypertrophic cardiomyopathy for Fabry disease using a filter-paper test: the FOCUS study. *Heart (British Cardiac Society)*. 2011 Jan;97(2):131–136.
 150. Sachdev B, Takenaka T, Teraguchi H, Tei C, Lee P, McKenna WJ, et al. Prevalence of Anderson-Fabry disease in male patients with late onset hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation*. 2002 Mar;105(12):1407–1411.
 151. Elliott P, Baker R, Pasquale F, Quarta G, Ebrahim H, Mehta AB, et al. Prevalence of Anderson-Fabry disease in patients with hypertrophic cardiomyopathy: the European Anderson-Fabry Disease survey. *Heart (British Cardiac Society)*. 2011 Dec;97(23):1957–1960.
 152. Smid BE, Tol L van der, Cecchi F, Elliott PM, Hughes DA, Linthorst GE, et al. Uncertain diagnosis of Fabry disease: consensus recommendation on diagnosis in adults with left ventricular hypertrophy and genetic variants of unknown significance. *International journal of cardiology*. 2014 Dec;177(2):400–408.
 153. Newman DB, Miranda WR, Matern D, Peck DS, Geske JB, Maleszewski JJ, et al. Cost Efficacy of α -Galactosidase A Enzyme Screening for Fabry Disease. *Mayo Clinic proceedings*. 2019 Jan;94(1):84–88.
 154. Lanthier S, Saposnik G, Lebovic G, Pope K, Selchen D, Moore DF, et al. Prevalence of Fabry Disease and Outcomes in Young

- Canadian Patients With Cryptogenic Ischemic Cerebrovascular Events. *Stroke*. 2017 Jul;48(7):1766–1772.
155. Baptista MV, Ferreira S, Pinho-E-Melo T, Carvalho M, Cruz VT, Carmona C, et al. Mutations of the GLA gene in young patients with stroke: the PORTYSTROKE study—screening genetic conditions in Portuguese young stroke patients. *Stroke*. 2010 Mar;41(3):431–436.
 156. Reisin RC, Mazziotti J, Cejas LL, Zimmerman A, Bonardo P, Pardal MF, et al. Prevalence of Fabry Disease in Young Patients with Stroke in Argentina. *Journal of stroke and cerebrovascular diseases: the official journal of National Stroke Association*. 2018 Mar;27(3):575–582.
 157. Lee T-H, Yang J-T, Lee J-D, Chang K-C, Peng T-I, Chang T-Y, et al. Genomic screening of Fabry disease in young stroke patients: the Taiwan experience and a review of the literature. *European journal of neurology*. 2018 Aug;
 158. Fancellu L, Borsini W, Romani I, Pirisi A, Deiana GA, Sechi E, et al. Exploratory screening for Fabry's disease in young adults with cerebrovascular disorders in northern Sardinia. *BMC neurology*. 2015 Dec;15:256.
 159. Tanislav C, Kaps M, Rolfs A, Böttcher T, Lackner K, Paschke E, et al. Frequency of Fabry disease in patients with small-fibre neuropathy of unknown aetiology: a pilot study. *European journal of neurology*. 2011 Apr;18(4):631–636.
 160. Namazova-Baranova LS, Baranov AA, Pushkov AA, Savostyanov KV. Fabry disease in children: a federal screening programme in Russia. *European journal of pediatrics*. 2017 Oct;176(10):1385–1391.
 161. Tol L van der, Smid BE, Poorthuis BJHM, Biegstraaten M, Deprez RHL, Linthorst GE, et al. A systematic review on screening for Fabry disease: prevalence of individuals with genetic variants of unknown significance. *Journal of medical genetics*. 2014 Jan;51(1):1–9.
 162. Hwu W-L, Chien Y-H, Lee N-C, Chiang S-C, Dobrovolny R, Huang A-C, et al. Newborn screening for Fabry disease in Taiwan reveals a high incidence of the later-onset GLA mutation

- c.936+919G>A (IVS4+919G>A). *Human mutation*. 2009 Oct;30(10):1397–1405.
163. Zeevi DA, Hakam-Spector E, Herskovitz Y, Beeri R, Elstein D, Altarescu G. An intronic haplotype in α galactosidase A is associated with reduced mRNA expression in males with cryptogenic stroke. *Gene*. 2014 Oct;549(2):275–279.
164. Orrell RW. Facioscapulohumeral dystrophy and scapuloperoneal syndromes. *Handbook of clinical neurology*. 2011;101:167–180.
165. Hamel J, Tawil R. Facioscapulohumeral Muscular Dystrophy: Update on Pathogenesis and Future Treatments. *Neurotherapeutics: the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*. 2018 Oct;15(4):863–871.
166. Schelleckes M, Lenders M, Guske K, Schmitz B, Tanislav C, Ständer S, et al. Cryptogenic stroke and small fiber neuropathy of unknown etiology in patients with alpha-galactosidase A -10T genotype. *Orphanet journal of rare diseases*. 2014 Nov;9:178.
167. Pisani A, Imbriaco M, Zizzo C, Albeggiani G, Colomba P, Alessandro R, et al. A classical phenotype of Anderson-Fabry disease in a female patient with intronic mutations of the GLA gene: a case report. *BMC cardiovascular disorders*. 2012 Jun;12:39.
168. Sakuraba H, Eng CM, Desnick RJ, Bishop DF. Invariant exon skipping in the human alpha-galactosidase A pre-mRNA: Ag+1 to t substitution in a 5'-splice site causing Fabry disease. *Genomics*. 1992 Apr;12(4):643–650.
169. Matsumura T, Osaka H, Sugiyama N, Kawanishi C, Maruyama Y, Suzuki K, et al. Novel acceptor splice site mutation in the invariant AG of intron 6 of alpha-galactosidase A gene, causing Fabry disease. *Mutations in brief no. 146*. Online. *Human mutation*. 1998;11(6):483.
170. Germain DP, Poenaru L. Fabry disease: identification of novel alpha-galactosidase A mutations and molecular carrier detection by use of fluorescent chemical cleavage of mismatches. *Biochemical and biophysical research communications*. 1999 Apr;257(3):708–713.

171. Lai L-W, Whitehair O, Wu M-J, O'Meara M, Lien Y-HH. Analysis of splice-site mutations of the alpha-galactosidase A gene in Fabry disease. *Clinical genetics*. 2003 Jun;63(6):476–482.
172. Duro G, Zizzo C, Cammarata G, Burlina A, Burlina A, Polo G, et al. Mutations in the GLA Gene and LysoGb3: Is It Really Anderson-Fabry Disease? *International journal of molecular sciences*. 2018 Nov;19(12).
173. Oder D, Liu D, Üçeyler N, Sommer C, Hu K, Salinger T, et al. Clinical impact of the alpha-galactosidase A gene single nucleotide polymorphism -10C>T: A single-center observational study. *Medicine*. 2018 May;97(21):e10669.
174. Ishii S, Nakao S, Minamikawa-Tachino R, Desnick RJ, Fan J-Q. Alternative splicing in the alpha-galactosidase A gene: increased exon inclusion results in the Fabry cardiac phenotype. *American journal of human genetics*. 2002 Apr;70(4):994–1002.
175. Watanabe T, Hanawa H, Suzuki T, Jiao S, Yoshida K, Ogura M, et al. A mutant mRNA expression in an endomyocardial biopsy sample obtained from a patient with a cardiac variant of Fabry disease caused by a novel acceptor splice site mutation in the invariant AG of intron 5 of the α -galactosidase A gene. *Internal medicine (Tokyo, Japan)*. 2013;52(7):777–780.
176. Higuchi T, Kobayashi M, Ogata J, Kaneshiro E, Shimada Y, Kobayashi H, et al. Identification of Cryptic Novel α -Galactosidase A Gene Mutations: Abnormal mRNA Splicing and Large Deletions. *JIMD reports*. 2016;30:63–72.
177. Okumiya T, Takenaka T, Ishii S, Kase R, Kamei S, Sakuraba H. Two novel mutations in the alpha-galactosidase gene in Japanese classical hemizygotes with Fabry disease. *The Japanese journal of human genetics*. 1996 Sep;41(3):313–321.
178. Eng CM, Resnick-Silverman LA, Niehaus DJ, Astrin KH, Desnick RJ. Nature and frequency of mutations in the alpha-galactosidase A gene that cause Fabry disease. *American journal of human genetics*. 1993 Dec;53(6):1186–1197.
179. Ashton-Prolla P, Tong B, Shabbeer J, Astrin KH, Eng CM, Desnick RJ. Fabry disease: twenty-two novel mutations in the

- alpha-galactosidase A gene and genotype/phenotype correlations in severely and mildly affected hemizygotes and heterozygotes. *Journal of investigative medicine: the official publication of the American Federation for Clinical Research*. 2000 Jul;48(4):227–235.
180. Yokoi T, Shinoda K, Ohno I, Kato K, Miyawaki T, Taniguchi N. A 3' splice site consensus sequence mutation in the intron 3 of the alpha-galactosidase A gene in a patient with Fabry disease. *Jinrui idengaku zasshi. The Japanese journal of human genetics*. 1991 Sep;36(3):245–250.
181. Davies J, Christomanou H, Winchester B, Malcolm S. Detection of 8 new mutations in the alpha-galactosidase A gene in Fabry disease. *Human molecular genetics*. 1994 Apr;3(4):667–669.
182. Rodríguez-Marí A, Coll MJ, Chabás A. Molecular analysis in Fabry disease in Spain: fifteen novel GLA mutations and identification of a homozygous female. *Human mutation*. 2003 Sep;22(3):258.
183. Eng CM, Ashley GA, Burgert TS, Enriquez AL, D'Souza M, Desnick RJ. Fabry disease: thirty-five mutations in the alpha-galactosidase A gene in patients with classic and variant phenotypes. *Molecular medicine (Cambridge, Mass.)*. 1997 Mar;3(3):174–182.
184. Filoni C, Caciotti A, Carraresi L, Donati MA, Mignani R, Parini R, et al. Unbalanced GLA mRNAs ratio quantified by real-time PCR in Fabry patients' fibroblasts results in Fabry disease. *European journal of human genetics: EJHG*. 2008 Nov;16(11):1311–1317.
185. Cabrera G, Perretta F. Fabry disease. A potential pitfall A family with a novel intronic mutation. *Molecular genetics and metabolism reports*. 2018 Dec;17:16–17.
186. Blyaydon D, Hill J, Winchester B. Fabry disease: 20 novel GLA mutations in 35 families. *Human mutation*. 2001 Nov;18(5):459.
187. Shabbeer J, Robinson M, Desnick RJ. Detection of alpha-galactosidase a mutations causing Fabry disease by denaturing high performance liquid chromatography. *Human mutation*. 2005 Mar;25(3):299–305.

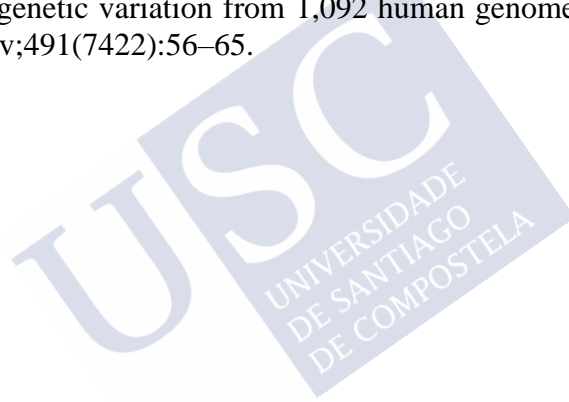
188. Oliveira JP, Ferreira S, Barceló J, Gaspar P, Carvalho F, Sá Miranda MC, et al. Effect of single-nucleotide polymorphisms of the 5' untranslated region of the human α -galactosidase gene on enzyme activity, and their frequencies in Portuguese caucasians. *Journal of inherited metabolic disease*. 2008 Dec;31 Suppl 2:S247–S253.
189. Oliveira JP, Ferreira S, Reguenga C, Carvalho F, Månsson J-E. The g.1170C>T polymorphism of the 5' untranslated region of the human alpha-galactosidase gene is associated with decreased enzyme expression—evidence from a family study. *Journal of inherited metabolic disease*. 2008 Dec;31 Suppl 2:S405–S413.
190. Ferri L, Guido C, Marca G la, Malvagia S, Cavicchi C, Fiumara A, et al. Fabry disease: polymorphic haplotypes and a novel missense mutation in the GLA gene. *Clinical genetics*. 2012 Mar;81(3):224–233.
191. <https://www.ine.es>. Instituto Nacional de Estadística (INE). Accedido 07/04/2019.
192. Chamoles NA, Blanco M, Gaggioli D. Fabry disease: enzymatic diagnosis in dried blood spots on filter paper. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 2001 Jun;308(1-2):195–196.
193. Gold H, Mirzaian M, Dekker N, Joao Ferraz M, Lugtenburg J, Codée JDC, et al. Quantification of globotriaosylsphingosine in plasma and urine of fabry patients by stable isotope ultraperformance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Clinical chemistry*. 2013 Mar;59(3):547–556.
194. Li L-C, Dahiya R. MethPrimer: designing primers for methylation PCRs. *Bioinformatics (Oxford, England)*. 2002 Nov;18(11):1427–1431.
195. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research*. 2001 May;29(9):e45.
196. Colon C, Ortolano S, Melcon-Crespo C, Alvarez JV, Lopez-Suarez OE, Couce ML, et al. Newborn screening for Fabry disease in the north-west of Spain. *European journal of pediatrics*. 2017 Aug;176(8):1075–1081.

197. Shabbeer J, Yasuda M, Benson SD, Desnick RJ. Fabry disease: identification of 50 novel alpha-galactosidase A mutations causing the classic phenotype and three-dimensional structural analysis of 29 missense mutations. *Human genomics*. 2006 Mar;2(5):297–309.
198. Vieitez I, Souto-Rodriguez O, Fernandez-Mosquera L, San Millan B, Teijeira S, Fernandez-Martin J, et al. Fabry disease in the Spanish population: observational study with detection of 77 patients. *Orphanet journal of rare diseases*. 2018 Apr;13(1):52.
199. Gaspar P, Herrera J, Rodrigues D, Cerezo S, Delgado R, Andrade CF, et al. Frequency of Fabry disease in male and female haemodialysis patients in Spain. *BMC medical genetics*. 2010 Feb;11:19.
200. Herrera J, Miranda CS. Prevalence of Fabry's disease within hemodialysis patients in Spain. *Clinical nephrology*. 2014 Feb;81(2):112–120.
201. Spada M, Pagliardini S, Yasuda M, Tukul T, Thiagarajan G, Sakuraba H, et al. High incidence of later-onset fabry disease revealed by newborn screening. *American journal of human genetics*. 2006 Jul;79(1):31–40.
202. Lin H-Y, Chong K-W, Hsu J-H, Yu H-C, Shih C-C, Huang C-H, et al. High incidence of the cardiac variant of Fabry disease revealed by newborn screening in the Taiwan Chinese population. *Circulation. Cardiovascular genetics*. 2009 Oct;2(5):450–456.
203. Inoue T, Hattori K, Ihara K, Ishii A, Nakamura K, Hirose S. Newborn screening for Fabry disease in Japan: prevalence and genotypes of Fabry disease in a pilot study. *Journal of human genetics*. 2013 Aug;58(8):548–552.
204. Gervas-Arruga J, Cebolla JJ, Irun P, Perez-Lopez J, Plaza L, Roche JC, et al. Increased glycolipid storage produced by the inheritance of a complex intronic haplotype in the α -galactosidase A (GLA) gene. *BMC genetics*. 2015 Sep;16:109.
205. Rolfs A, Fazekas F, Grittner U, Dichgans M, Martus P, Holzhausen M, et al. Acute cerebrovascular disease in the

- young: the Stroke in Young Fabry Patients study. *Stroke*. 2013 Feb;44(2):340–349.
206. Terry W, Vanholder R, Hemelsoet D, Leroy BP, Van Biesen W, De Schoenmakere G, et al. Questioning the Pathogenic Role of the GLA p.Ala143Thr “Mutation” in Fabry Disease: Implications for Screening Studies and ERT. *JIMD reports*. 2013;8:101–108.
207. Lenders M, Weidemann F, Kurschat C, Canaan-Kühl S, Duning T, Stypmann J, et al. Alpha-Galactosidase A p.A143T, a non-Fabry disease-causing variant. *Orphanet journal of rare diseases*. 2016 May;11(1):54.
208. Hauth L, Kerstens J, Yperzeele L, Eyskens F, Parizel PM, Willekens B. Galactosidase Alpha p.A143T Variant Fabry Disease May Result in a Phenotype With Multifocal Microvascular Cerebral Involvement at a Young Age. *Frontiers in neurology*. 2018;9:336.
209. Arends M, Wanner C, Hughes D, Mehta A, Oder D, Watkinson OT, et al. Characterization of Classical and Nonclassical Fabry Disease: A Multicenter Study. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2017 May;28(5):1631–1641.
210. Robert J.Desnick SK Dana O Doheny Brenden Chen Chunli Yu Irina Nazarenko Beomhee Lee Andrea M Atherton Rachel Montel Asha Singh. Fabry disease: The α -galactosidase A (GLA) c.427G>A (A143T) mutation, effect of the 5'-10C>T polymorphism. *Molecular Genetics and Metabolism*. 2015;114:S37.
211. Lenders M, Duning T, Schelleckes M, Schmitz B, Stander S, Rolfs A, et al. Multifocal white matter lesions associated with the D313Y mutation of the α -galactosidase A gene. *PLoS one*. 2013;8(2):e55565.
212. Becker J, Rolfs A, Karabul N, Berlit P, Kraemer M. D313Y mutation in the differential diagnosis of white matter lesions: Experiences from a multiple sclerosis outpatient clinic. *Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)*. 2016 Oct;22(11):1502–1505.

213. Hasholt L, Ballegaard M, Bundgaard H, Christiansen M, Law I, Lund AM, et al. The D313Y variant in the GLA gene - no evidence of a pathogenic role in Fabry disease. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation*. 2017 Dec;77(8):617–621.
214. Koulousios K, Stylianos K, Pateinakis P, Zamanakou M, Loules G, Manou E, et al. Fabry disease due to D313Y and novel GLA mutations. *BMJ open*. 2017 Oct;7(10):e017098.
215. Niemann M, Rofls A, Giese A, Mascher H, Breunig F, Ertl G, et al. Lyso-Gb3 Indicates that the Alpha-Galactosidase A Mutation D313Y is not Clinically Relevant for Fabry Disease. *JIMD reports*. 2013;7:99–102.
216. Oder D, Üçeyler N, Liu D, Hu K, Petritsch B, Sommer C, et al. Organ manifestations and long-term outcome of Fabry disease in patients with the GLA haplotype D313Y. *BMJ open*. 2016 Apr;6(4):e010422.
217. Froissart R, Guffon N, Vanier MT, Desnick RJ, Maire I. Fabry disease: D313Y is an alpha-galactosidase A sequence variant that causes pseudodeficient activity in plasma. *Molecular genetics and metabolism*. 2003 Nov;80(3):307–314.
218. Lukas J, Giese A-K, Markoff A, Grittner U, Kolodny E, Mascher H, et al. Functional characterisation of alpha-galactosidase a mutations as a basis for a new classification system in fabry disease. *PLoS genetics*. 2013;9(8):e1003632.
219. Moulin M du, Muschol N. p.D313Y is more than just a polymorphism in Fabry disease. *Clinical genetics*. 2018 Jun;93(6):1258.
220. Bono C, Nuzzo D, Albegiani G, Zizzo C, Francofonte D, Iemolo F, et al. Genetic screening of Fabry patients with EcoTILLING and HRM technology. *BMC research notes*. 2011 Sep;4:323.
221. Tuttolomondo A, Duro G, Pecoraro R, Simonetta I, Miceli S, Colomba P, et al. A family with various symptomatology suggestive of Anderson-Fabry disease and a genetic polymorphism of alpha galactosidase A gene. *Clinical biochemistry*. 2015 Jan;48(1-2):55–62.

222. Apelland T, Gude E, Strøm EH, Gullestad L, Eiklid KL, Månsson J-E, et al. Familial globotriaosylceramide-associated cardiomyopathy mimicking Fabry disease. *Heart (British Cardiac Society)*. 2014 Nov;100(22):1793–1798.
223. A G. Fabry disease. In: Elstein BM Altarescu G, editor. Springer, Heidelberg; 2010. p. 3–19.
224. Ferreira S, Reguenga C, Oliveira JP. The Modulatory Effects of the Polymorphisms in GLA 5'-Untranslated Region Upon Gene Expression Are Cell-Type Specific. *JIMD reports*. 2015;23:27–34.
225. Consortium 1000 Genomes Project, Abecasis GR, Auton A, Brooks LD, DePristo MA, Durbin RM, et al. An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes. *Nature*. 2012 Nov;491(7422):56–65.







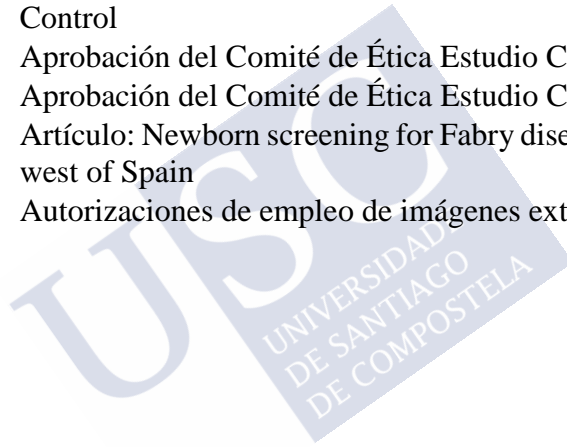
Anexos



Anexos

Se muestra en este capítulo de anexos los siguientes documentos empleados en la realización de esta tesis doctoral:

- Modelo de consentimiento informado Estudio Descriptivo
- Hoja de recogida de datos Estudio Caso-Control
- Modelo de consentimiento informado Estudio Caso-Control
- Aprobación del Comité de Ética Estudio Cribado Neonatal
- Aprobación del Comité de Ética Estudio Caso-Control
- Artículo: Newborn screening for Fabry disease in the north-west of Spain
- Autorizaciones de empleo de imágenes externas





MODELO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO ESTUDIO DESCRIPTIVO

ESTUDIO: "Estudio piloto para la validación del diagnóstico precoz de la enfermedad de Fabry"

Investigadores Principales: Dr. Cristóbal Colón Mejeras, Dr. José D. Moure González

Introducción

Le invitamos a participar en un proyecto que pretende diagnosticar a pacientes con enfermedad de Fabry antes de que aparezcan los síntomas. La enfermedad de Fabry es un trastorno metabólico hereditario, de evolución crónica y progresiva caracterizada por la alteración de la degradación de moléculas complejas, por lo cual se acumulan estas sustancias. La mayoría de los pacientes son clínicamente normales al nacimiento pero pueden desarrollar síntomas tan precozmente como en la infancia. A pesar de que no hay un tratamiento curativo, existe disponibilidad de cierto número de opciones terapéuticas para mejorar la calidad de vida, como es el tratamiento con un sustitutivo enzimático. Para conseguir esto está surgiendo la posibilidad de identificar a los pacientes afectados tan pronto como en el momento del cribado neonatal, antes de que empiecen las manifestaciones clínicas graves e irreversibles.

Objetivo

Validar una prueba de laboratorio para intentar realizar el diagnóstico precoz de posibles casos de enfermedad de Fabry empleando el sobrante de la misma muestra de sangre que se emplea para el cribado neonatal.

Metodología empleada

Seleccionar al azar un número aproximado de 100 familias a partir de la enviada por los padres para el Programa de Detección Precoz de Enfermedades Metabólicas y, fuera del programa de cribado neonatal, identificar a posibles personas afectas de la enfermedad. En su caso nos proponemos hacer una entrevista personal sobre los antecedentes familiares de patología y sintomatología relacionada con esta enfermedad para establecer unos estándares para la detección de esta patología.

Beneficios esperados, riesgos y posibles acontecimientos adversos

Estos análisis son de cribado, por ello debe tenerse en cuenta que existe la posibilidad de obtener un resultado falso negativo o positivo al igual que en el resto de pruebas de detección precoz neonatal llevadas a cabo. Falso positivo sería identificar como posible afecto a aquel que no lo es, y falso negativo sería no identificar como afecto al que sí tiene la enfermedad.

No necesitaremos obtener una nueva muestra de sangre del niño/a, ya que se utilizaría el sobrante de la misma muestra que se emplea para el cribado neonatal.

En caso de confirmarse el defecto enzimático, el niño se beneficiará de un diagnóstico precoz, lo que conllevará a su inclusión en la atención por parte de los médicos de la Unidad de Diagnóstico y Seguimiento de Metabolopatías del Servicio de Neonatología del C. H. Universitario de Santiago quienes les asesorarán sobre las adecuadas medidas de tratamiento y consejo genético. Aún así el niño afecto podría no obtener beneficio alguno, a pesar de haber participado en el presente estudio.

Los investigadores Dr. Moure y Dr. Colón estarán siempre a disposición de las familias que deseen incluirse en el estudio para responder a todas sus dudas concernientes a su participación. Además informarán sobre cualquier hecho adicional que surja durante la realización del estudio que sea de interés para los pacientes y sus familias.

Compromiso de confidencialidad

Se garantizará el anonimato y se seguirán los procedimientos contemplados en la Ley Orgánica 15/1999 de 13 de diciembre de protección de datos de carácter personal.

HOJA DE RECOGIDA DE DATOS ESTUDIO CASO - CONTROL

Tipo de sujeto: caso/control	NÚMERO DE IDENTIFICACIÓN:		
VARIABLES SOCIODEMGRÁFICAS			
Fecha de Nacimiento:	Sexo: masculino/femenino:	Etnia:	
Lugar de residencia habitual:			
ANTECEDENTES PERSONALES			
-Datos del Embarazo			
Tipo concepción: Espontánea/técnicas de fertilización			
Evolución/Incidencias:			
-Datos del Parto			
Tipo de Parto:		Si cesárea especificar la causa:	
APGAR:			
-Datos del Periodo Neonatal			
Ingreso si/no		Especificar diagnóstico al alta:	
Screening metabólico normal/alterado			
-Patología previa: si/no		Tipo:	Edad diagnóstico:
-Intervenciones Quirúrgicas: si/no		Tipo:	Tratamiento actual:
-Desarrollo psicomotor: normal/alterado		Edad:	
ANTECEDENTES FAMILIARES			
*Paciente caso:			
Padres/madre portador de la mutación:			
Edad:			
M clínicas (ocular/ cutánea/ renal/ cardíaca/ neurológica/gastrointestinal/otras):			
Número de hermanos:		Lugar que ocupa: Enfermedades	
Abuelos portadores de la mutación:			
Edad:			
M clínicas (ocular/ cutánea/ renal/ cardíaca/ neurológica/gastrointestinal/otras):			
Enfermedades en otros miembros de la familia (especificar tipo y parentesco con el niño):			
*Paciente control:			
Padres: Edad:		Enfermedades:	
Número de hermanos:		Lugar que ocupa: Enfermedades:	
Enfermedades en otros miembros de la familia (especificar tipo y parentesco con el niño):			
EXPLORACIÓN FÍSICA			
Antropometría: Peso		Talla	IMC
Fenotipo:		Alteraciones cutáneas:	
ACP: Abdomen:	Exploración neurológica:Aparato locomotor:		
Otros datos relevantes:			
ESTUDIOS REALIZADOS			
Actividad enzimática α -GalA			
Estudio genético de GLA			
Cuantificación mRNA			
Cantidad de proteína			
Versión 03, Fecha 06/10/2015			

MODELO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO ESTUDIO CASO - CONTROL

DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO PARA LA PARTICIPACIÓN EN UN ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN

TÍTULO: Implementación de los métodos de diagnóstico en la Enfermedad de Fabry

Yo, (padre) y Yo, (madre), o Yo
..... (tutor legal) en calidad de representante/s legal/es de

- He leído la hoja de información al participante del estudio arriba mencionado que se me entregó, he podido hablar con y hacerle todas las preguntas sobre el estudio necesarias para comprender sus condiciones y considero que he recibido suficiente información sobre el estudio.
- Comprendo que mi participación es voluntaria, y que puedo retirarme del estudio cuando quiera, sin tener que dar explicaciones y sin que esto repercuta en mis cuidados médicos.
- Accedo a que se utilicen mis datos en las condiciones detalladas en la hoja de información al participante.
- Presto libremente mi conformidad para participar en el estudio.
- En caso de solo ser firmado por un progenitor, el firmante afirma que conoce la ausencia de oposición del otro progenitor.

Respeto a la conservación y utilización futura de los datos y/o muestras detallada en la hoja de información al participante,

- NO accedo a que mis datos y/o muestras sean conservados una vez terminado el presente estudio
- Accedo a que los datos y/o muestras se conserven para usos posteriores en líneas de investigación relacionadas con la presente, y en las condiciones mencionadas.

En cuanto a los resultados de las pruebas realizadas,

- DESEO conocer los resultados de mis pruebas
- NO DESEO conocer los resultados de mis pruebas

El/la representante legal,

El/la investigador/a,

Fdo.: (padre)

Fdo.: (madre)

Fdo.: (tutor legal)

Fdo.:

Fecha:

Fecha:

APROBACIÓN DEL COMITÉ DE ÉTICA ESTUDIO CRIBADO NEONATAL



Edificio Administrativo San Lázaro
15703 SANTIAGO DE COMPOSTELA
Teléfono: 881 54 28 13 - Fax: 881 54 03 07
www.sergas.es



Comité Ético de Investigación clínica
Telf: 881 54 64 25 FAX: 881 54 18 04
Email: ceic@sergas.es

DITAME DO COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA DE GALIZA

D. Xoán X. Casas Rodríguez , Secretario do Comité Ético de Investigación Clínica de Galiza

CERTIFICA:

Que este Comité avaliou na súa reunión do día 26/02/2009 o estudo:

Título: Estudio piloto para la validación del diagnóstico precoz de la enfermedad de Fabry

Promotor: Cristobal Colón Mejeras

Código do Promotor:

Código de Rexistro CEIC de Galicia: 2008/390

Que se cumpren os requisitos éticos aplicábeis a este tipo de estudos, están xustificadas os riscos e molestias previsíbeis para o suxeito e é adecuado o procedemento para obter o consentimento informado.

E que este Comité acepta, de conformidade cos seus Procedementos Normalizados de Traballo, que o devandito estudo sexa realizado nos seguintes centros:


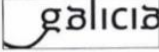
Centros	Investigadores principais
C.H. Universitario de Santiago	Cristobal Colón Mejeras

En Santiago de Compostela a 5 de marzo de 2009



Xoán X. Casas Rodríguez

APROBACIÓN DEL COMITÉ DE ÉTICA ESTUDIO CASO - CONTROL

 XUNTA DE GALICIA CONSELLERÍA DE SANIDADE Secretaría Xeral Técnica	Secretaría Técnica Comité Autonómico de Ética da Investigación de Galicia Secretaría Xeral, Consellería de Sanidade Edificio Administrativo San Lázaro 15703 SANTIAGO DE COMPOSTELA Tel: 981 546425; ceic@sergas.es	
--	--	---

DICTAMEN DEL COMITÉ DE ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN DE PONTEVEDRA-VIGO-OURENSE

María Asunción Verdejo González, secretaria del Comité de Ética de la Investigación de Pontevedra-Vigo-Ourense

CERTIFICA: Que este Comité evaluó en su reunión del día 22/09/2015 el estudio:

Título: Implementación de los métodos de diagnóstico en la enfermedad de Fabry
Promotor: *Servicio de Pediatría C.H. Universitario de Vigo e Instituto de Investigación Biomédica Vigo-Ourense-Pontevedra*
Tipo de estudio: Outros
Version: Versión 02, Fecha 20/08/15 y Documentos de consentimiento informado de la misma fecha
Código de Registro: 2015/464


Y, tomando en consideración las siguientes cuestiones:

- La pertinencia del estudio, teniendo en cuenta el conocimiento disponible, así como los requisitos legales aplicables, y en particular la Ley 14/2007, de investigación biomédica, el Real Decreto 1716/2011, de 18 de noviembre, por el que se establecen los requisitos básicos de autorización y funcionamiento de los biobancos con fines de investigación biomédica y del tratamiento de las muestras biológicas de origen humano, y se regula el funcionamiento y organización del Registro Nacional de Biobancos para investigación biomédica, la ORDEN SAS/3470/2009, de 16 de diciembre, por la que se publican las Directrices sobre estudios Posautorización de Tipo Observacional para medicamentos de uso humano, y el la Circular nº 07 / 2004, investigaciones clínicas con productos sanitarios.
- La idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio, justificación de los riesgos y molestias previsibles para el sujeto, así como los beneficios esperados.
- Los principios éticos de la Declaración de Helsinki vigente.
- Los Procedimientos Normalizados de Trabajo del Comité.

Emite un **INFORME FAVORABLE** para la realización del estudio por el/la investigador/a del centro:

Centros C.H. Universitario de Vigo	Investigadores Principales Cristina Melcón Crespo
---------------------------------------	--

En Vigo, a 06 de octubre de 2015
La secretaria



**ARTÍCULO: NEWBORN SCREENING FOR FABRY DISEASE IN THE
NORTH-WEST OF SPAIN**



Newborn screening for Fabry disease in the north-west of Spain

Cristobal Colon¹ · Saida Ortolano² · Cristina Melcon-Crespo^{2,3} · Jose V. Alvarez¹ ·
Olalla E. Lopez-Suarez¹ · Maria L. Couce¹ · José R. Fernández-Lorenzo^{2,3}

Received: 16 January 2017 / Revised: 6 June 2017 / Accepted: 7 June 2017 / Published online: 23 June 2017
© The Author(s) 2017. This article is an open access publication

Abstract Fabry disease is an X-linked lysosomal storage disorder caused by the impairment of α -galactosidase A. Enzyme replacement therapy is available to treat patients, who often experience delayed diagnosis. A newborn screening for Fabry disease was performed to study the prevalence of the pathology and to evaluate the possibility to implement the test in systematic screenings. We collected 14,600 dried blood spot samples (7575 males and 7025 females) and carried out a diagnostic study by fluorometric measurement of α -galactosidase A enzymatic activity and *GLA* gene sequencing. We detected one patient with a mutation in *GLA* associated

with classical Fabry Disease (M290I), ten subjects carrying genetic variants of uncertain diagnosis (S126G, R118C, A143T), and a girl with the non-characterized variant F18Y, which was not previously described. Additional 25 samples presented nucleotide substitutions described as polymorphisms (D313Y, rs2071225, and rs2071397). The estimated prevalence for Fabry disease in north-western Spanish males is of 0.013%.

Conclusion: These results confirm that the prevalence of Fabry disease is underestimated and systematic screening is feasible; however, further characterization of variants of un-

C.C. and S.O. contributed equally to this work.

Communicated by: Peter de Winter

Revisions received: 3 May 2017 / 6 June 2017

✉ Saida Ortolano
saida.ortolano@sergas.es

Cristobal Colon
Cristobal.Colon.Mejeras@sergas.es

Cristina Melcon-Crespo
Cristina.Melcon.Crespo@sergas.es

Jose V. Alvarez
jvictor_alvarez@hotmail.com

Olalla E. Lopez-Suarez
Olalla.Elena.Lopez.Suarez@sergas.es

Maria L. Couce
Maria.Luz.Couce.Pico@sergas.es

José R. Fernández-Lorenzo
Jose.Ramon.Fernandez.Lorenzo@sergas.es

¹ Unit of Diagnosis and Treatment of Congenital Metabolic Diseases, Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, Spain

² Rare Diseases & Pediatric Medicine Research Group, Galicia Sur Health Research Institute (IIS Galicia Sur), SERGAS-UVIGO, Hospital Álvaro Cunqueiro, Bloque técnico, p12 zona A, Estrada Clara Campoamor 341, Vigo 36312, Pontevedra, Spain

³ Pediatrics Department, Xerencia de Xestión Integrada de Vigo, SERGAS, Vigo, Spain

certain clinical significance is necessary to establish protocols of patients' management.

What is Known:

- *Fabry disease is a rare disease of delayed diagnosis, whose prevalence is underestimated. However, early diagnosis is important for better efficiency of the current available treatment.*

What is New:

- *This newborn screening for Fabry disease performed on Spanish population reveals a prevalence of genetic alterations in GLA of 0.1% in males (0.013% with classic Fabry disease) and also characterizes these modifications in order to discriminate between pathogenic mutations and genetic variants of unknown significance.*

Keywords Fabry disease · Newborn screening · Lysosomal storage diseases · Genetic variants of unknown significance

Abbreviations

ACHDNC	Advisory Committee on Hereditary Disorders in Newborns and Children
CF	Cystic fibrosis
DBS	Dried blood spots
FD	Fabry disease
GVUS	Genetic variants of unknown significance
LSDs	Lysosomal storage disorders
MPS	Mucopolysaccharidosis
NBS	Newborn screening
PPV	Positive predictive value
SNP	Single nucleotide polymorphism
α -Gala	α -Galactosidase A

Introduction

Lysosomal storage disorders (LSDs) are good candidates for newborn screening (NBS) since there are diagnostic methods and treatments available [1, 2]. Indeed, Pompe disease and mucopolysaccharidosis I (MPS I) were included by the Advisory Committee on Hereditary Disorders in Newborns and Children (ACHDNC) in the recommended uniform screening panels (RUSP). This board, which was created by the US Department of Health and Human Services to harmonize NBS panels and methodologies, also evaluated the suitability of early detection for other LSDs, such as Krabbe disease or Fabry disease (FD, OMIM#301500) [3, 4].

In FD, NBS has questionable benefits since the onset of the pathology occurs in adult age and available treatments present important limitations (i.e., low half-life, bioavailability, and compliance, as well as possible immunogenicity). Furthermore, the benefits of treating it since early childhood are still uncertain [5, 6].

An additional point of discussion is the frequent detection of variants in the *GLA* gene (NC_000023.1, mRNA NM_000169.2) with unclear diagnostic interpretation (i.e., p.A143T, p.R118C, p.E66Q...), which complicates the management of subjects identified in FD screenings. These variants have been related to a late-onset phenotype, and patients are occasionally treated with enzyme replacement therapy [7, 8].

Due to these controversial issues, ACHDNC rejected to include FD in RUSP in their first evaluation; however, local laws supported by newborn screening advocates and parents allowed the implementation of systematic screening for FD in Illinois and Missouri, which was also facilitated by the development of cost-sustainable protocols. Pilot studies have also been performed in other states, such as New Jersey and New Mexico, among others [9]. Currently, the discussion on including FD in the RUSP is re-opened due to the development of more compliant treatments, based on orally administering pharmaceutical chaperones. Migalstat (Galafold® Amicus therapeutics) is up to date the only pharmacological chaperon for FD, which obtained the European Medicine Agency (EMA) approval for commercialization [10].

The aim of this study is to estimate the prevalence of FD in the population of Galicia (north-west of Spain) and to evaluate whether it is feasible to include this disease in the NBS program implemented by the public healthcare system of our region, which is currently detecting over 20 metabolic diseases.

Materials and methods

Aim and design of the study A newborn screening for Fabry disease was performed to study the real prevalence of the pathology in our region and to evaluate the possibility to implement the test in systematic screenings. We carried out a diagnostic study based on enzymatic screening of α -galactosidase A.

Subjects The enzymatic screening was performed in asymptomatic newborns by collecting dried blood spots (DBSs) from 14,600 individuals (7575 males and 7025 females) who represent 99% of all births in Galicia during the year 2008. Although enzymatic tests are not reliable in screening females, we decided to perform the analysis also in females to estimate if prevalence in males was significantly different from the prevalence in the whole population. This would provide an indirect measure of the number of females that the enzymatic test fails to detect.

Protocol Samples were gathered between day 3 and 5 after birth. Clinical history of the subjects was consulted by authorized physicians through the Galician Healthcare System

Clinical History Database (IANUS) in order to collect symptoms related to the disease, birth weight, and gestational age. The study was approved by the Healthcare Ethics Committee of Santiago de Compostela University Hospital. Two independent measurements were performed in samples which present lower activity than the cutoff. Informed consent was asked to patients with confirmed low levels of enzymatic activity before performing *GLA* sequencing. A genetic study was also performed to the patient's parents of this group upon consent.

Measurements Enzymatic activity of α -galactosidase A (α -GalA) was measured following the fluorometric method described by Chamoles [11]. Briefly, the assay was performed on triplicates in buffer citrate-phosphate 0.15 M pH 4.2, using 4-methylumbelliferil-galactopiranoside substrate (2 mM, Glycosynth, UK) in the presence of *N*-acetylgalactosamine (70 mM, Sigma-Aldrich). α -GalA activity was expressed as micromoles of substrate per hour and liter of blood ($\mu\text{mol/Lh}$).

For genetic study, the seven exons of *GLA* were amplified by PCR with specific primers and were sequenced by the Sanger method, using the Chromas 2.4. software to detect point mutations and small deletions or insertions in exons and near intronic regions (± 25 bp).

Data analysis Correlation of enzymatic activity with birth weight and gestational age was analyzed using the Pearson correlation coefficients. The association between enzymatic activity and gestational age (<35 vs. >35 weeks) or low birth weight (<2500 g) was tested using χ^2 test for contingency tables. The cutoff value for enzymatic activity was determined using the 0.5 percentile and was adjusted to take into account correlating variables like sex, weight, and gestational age. To establish the appropriate cutoff value, we quantify the α -GalA activity in a total of 2168 healthy newborns. The average activity was 5.1 $\mu\text{mol/Lh}$ (CI 95% 5.0–5.2) and the median was 4.57 (95% CI 4.46 to 4.71). Prevalence, positive predictive value (PPV), and method accuracy for the diagnostic protocol were calculated using the MedCalc 16.4.3 software (Oostende University, Belgium); CI was indicated.

Results

To identify FD positive subjects, we determined a cutoff value of 1.7 $\mu\text{mol/Lh}$ applying the 0.5 percentile to the cohort of enzymatic activity data; however, this reference was raised at 2 $\mu\text{mol/Lh}$ so that we could take into account correlating variables and avoid false negatives.

Indeed, heterozygous girls have higher residual activity compared to boys, and we calculated that α -GalA activity also correlates with birth weight ($r = -0.2468$, $p < 0.0001$, 95% CI = -0.3027 to -0.1892 , F -ratio = 68.1874, $p < 0.001$) and gestational age ($r = -0.3026$, $p < 0.0001$, 95% CI = -0.3581 to

-0.2450 , F -ratio = 99.9011, $p < 0.001$). Pre-term babies (<35 weeks gestation) and low birth weight newborns (<2500 g) present higher enzyme levels than term infants (9.1 versus 4.9, $t = 10.721$, DF = 991, $p < 0.0001$) and normal weight children (7.0 versus 4.9, $t = 8.499$, DF = 1051, $p < 0.0001$).

Following fluorimetric tests, 14,494 samples presented α -GalA activity ≥ 2 $\mu\text{mol/Lh}$, while enzymatic levels in 106 samples were lower than the cutoff (Fig. 1), as confirmed by a second measurement. Among patients with enzymatic activity below ≥ 2 $\mu\text{mol/Lh}$, we obtained consent for *GLA* sequencing in 101 subjects (68 males and 33 females), while the remaining 5 (females) were excluded from the analysis.

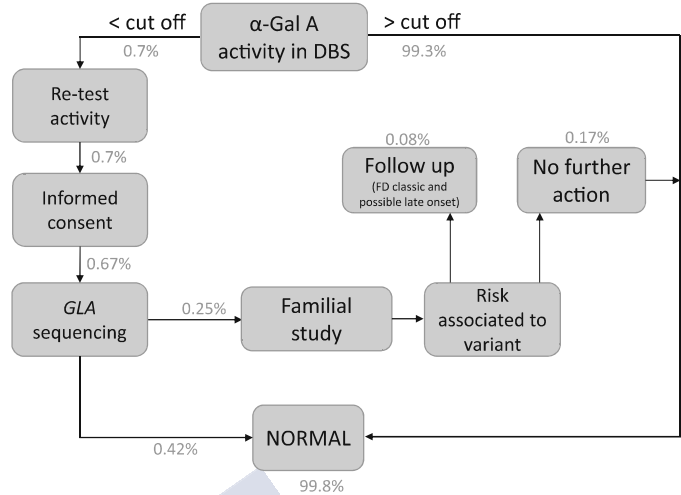
Genetic variants in *GLA* were detected in 37 patients (20 males and 17 females) as summarized in Table 1.

The p.M290I (c.870G>A) identified in one male patient was previously described as pathogenic and associated to classical FD. Methionine 290 is conserved in at least three α -galactosidase and one β -galactosidase orthologues, and its substitution is related to the misfolding of the protein [12].

The p.F18Y (c.53T>A) missense non-characterized variant was identified in a heterozygous patient, who at the moment does not have a definitive diagnosis of FD. This single nucleotide polymorphism (SNP) was not reported earlier in the Human Mutation Database; [13] however, the database includes as pathogenic a FD-related mutation of phenylalanine 18 with serine. Like serine, tyrosine is more polar than phenylalanine and may alter the hydrophobic interactions of the molecule. A clinical follow-up of the girl, who inherited the mutation from the mother, revealed that she presented dermatological lesions of unidentified cause. She also suffered transitory respiratory impairment and underwent transfontanelle ultrasound, since she presented macrocephalic features, although the exam failed to detect any kind of alteration. At the age of 4, she was also explored in cardiology because extrasystoles were detected. The mother of the index case refused to further collaborate to the study; however, she presented several skin lesions, which have not been studied and the grandfather of the index case died at the age of 32 due to melanoma. Other members of the family (siblings of the mother of the index case, 3 females and 2 males) presented several non-specific symptoms but refused to be tested for FD. One uncle presented angiokeratoma-like lesions and a lesion on the knee which was biopsied. Biopsy examination determined the presence of inflammation and enlarged cells with birefringent-deposited material. One aunt presented recurrent abdominal pain, hearing loss, and occasional pruritus in the extremities.

In the remaining subjects, we detected genetic variants of uncertain significance (GVUS) such as p.R118C (c.352C>T), p.A143T (c.427G>A), and p.S126G (c.376A>G), as well as the pseudodeficiency allele p.D313Y (c.937G>T), and the intronic variants rs2071225 and rs2071397.

Fig. 1 A description of the FD screening protocol. Percentage of subjects (males and females) identified in each step are indicated



Since enzymatic testing is not conclusive for females, we calculated the prevalence of FD and the performance of the diagnostic test considering the data obtained in the male population. The estimated prevalence is of 0.013% (1:7575 males); the PPV of the current screening is 1.47% with a method accuracy of 99.12% (CI 98.9–99.3) and a false positive rate of 0.88%.

Discussion

The FD prevalence estimated in this study is considerably more frequent than the initially described [14], and the values are comparable to those reported in other studies, which were carried out in different geographical areas. A study conducted in Japanese newborns [15] reported a prevalence of 1:7057 live births with FD classical phenotype, increased to 1:3024, including uncharacterized *GLA* variants. Previous NBS studies in Taiwan and Italy estimated a prevalence of, respectively, 1:2445 live births and 1:3100 males [16, 17], including *GLA* variants of uncertain clinical significance. Van der Tol et al. [18] conducted a systematic review of FD screening studies to recalculate the prevalence of the pathology by discriminating mutations and GVUS and concluded that 90% of the identified cases harbored variants of unclear significance. In European asymptomatic newborns, the most frequent genetic alterations reported p.A143T, p.R112H, and p.D313Y, while in a Taiwanese study, rs2071397 was found in 83% of the patients. Controversial variants were also detected in 84 out of 28,165 patients enrolled in screening studies of high-risk populations (prevalence = 0.3%), in which the classical FD phenotype has a prevalence of 0.12%. Since in screening studies, where GVUS

were identified, the selected patients presented cardiac lesion or end-stage renal disease, it is still arguable if these genotypes, which are relatively frequent in the general population (p.A143T = 0.09% and p.R118C = 0.04%), could be directly related to FD and up to date it is recommended not to consider these subjects as patients unless a biopsy examination confirms the presence of deposits [19].

The detection of p.D313Y SNP, which is present in 0.3% of the population [18], is also frequent in previous screening studies; however, there is a general consent in considering this SNP as a pseudodeficiency allele [20].

The nucleotide substitutions in intronic region identified in our study, as well as in previous reports, are validated SNPs [21]. Even if it has been shown that when these SNPs are part of complex haplotypes, they can be involved in *GLA* transcription defects [22, 23], the mechanisms through which transcription is inhibited have not been clarified and these individuals cannot be considered as patients without further evidences.

The most recent NBS studies performed in Washington [24] and Missouri [9] report a FD prevalence of 1:7800 live births (not specifying how many late onset or GVUS) or 1:2913 (10 classic, 4 late onset, and 1 GVUS), respectively. The identified subjects in the Missouri study with *GLA* variants are extensively followed up to determine which individuals actually develop a FD-related phenotype. This follow-up is essential to identify pathogenic and late-onset variants in order to establish a definitive diagnosis.

The second aim of our study was to evaluate the suitability of performing NBS screening for FD in our community by implementing an appropriate method. Although the applied protocol allowed to reach results which are consistent with

Table 1 α -GalA activity levels obtained in two independent biochemical analyses and mutations detected by genetic sequencing. Female heterozygous patients are indicated in italics. The classical FD patient was highlighted with bold font

Patient	Sex	Activity 1st test ($\mu\text{mol/Lh}$)	Activity 2nd test ($\mu\text{mol/Lh}$)	Genetic variant
1	M	0.6	0.6	M290I, rs2071397, rs2071225
2	<i>F</i>	<i>1.6</i>	<i>1.6</i>	<i>F18Y/wt</i>
3	<i>F</i>	<i>2.0</i>	<i>1.5</i>	<i>S126G, rs2071397/wt</i>
4	M	1.7	1.4	A143T
5	<i>F</i>	<i>1.7</i>	<i>1.9</i>	<i>A143T/wt</i>
6	M	0.7	1.1	A143T
7	M	1.7	1.3	R118C
8	<i>F</i>	<i>1.4</i>	<i>1.6</i>	<i>R118C/wt</i>
9	M	1.1	1.5	R118C
10	M	1.4	1.0	R118C
11	M	1.7	1.6	R118C
12	M	2.0	1.8	R118C
13	<i>F</i>	<i>1.9</i>	<i>1.5</i>	<i>D313Y, rs2071225, rs2071397/wt</i>
14	M	1.9	1.2	D313Y
15	M	1.8	1.9	D313Y
16	M	1.7	1.6	D313Y
17	<i>F</i>	<i>1.9</i>	<i>1.7</i>	<i>rs2071225/wt</i>
18	<i>F</i>	<i>1.9</i>	<i>1.8</i>	<i>rs2071225/wt</i>
19	M	0.6	0.3	rs2071225
20	M	1.4	1.8	rs2071397
21	<i>F</i>	<i>1.8</i>	<i>1.6</i>	<i>rs2071397/wt</i>
22	<i>F</i>	<i>1.5</i>	<i>2.0</i>	<i>rs2071397/wt</i>
23	M	1.3	1.1	rs2071397
24	<i>F</i>	<i>1.4</i>	<i>1.9</i>	<i>rs2071397/wt</i>
25	<i>F</i>	<i>1.8</i>	<i>1.8</i>	<i>rs2071397/wt</i>
26	M	1.3	1.9	rs2071397
27	<i>F</i>	<i>1.6</i>	<i>1.8</i>	<i>rs2071397/wt</i>
28	M	1.2	1.8	rs2071225, rs2071397
29	<i>F</i>	<i>1.7</i>	<i>2.0</i>	<i>rs2071225, rs2071397/wt</i>
30	M	1.4	1.5	rs2071225, rs2071397
31	<i>F</i>	<i>1.8</i>	<i>0.9</i>	<i>rs2071225, rs2071397/wt</i>
32	M	1.6	1.8	rs2071225, rs2071397
33	<i>F</i>	<i>1.9</i>	<i>1.7</i>	<i>rs2071225, rs2071397/wt</i>
34	M	1.8	1.6	rs2071225, rs2071397
35	M	1.9	1.9	rs2071225, rs2071397
36	<i>F</i>	<i>2.0</i>	<i>1.9</i>	<i>rs2071225, rs2071397/wt</i>
37	<i>F</i>	<i>1.9</i>	<i>1.7</i>	<i>rs2071225, rs2071397/wt</i>

the ones reported in other literature, the method could be meliorated to reduce false-positive rates (FP = 0.88%) and therefore cost of determinations. Nevertheless, the estimated method accuracy and PPV are comparable with the ones obtained, using the same samples for the determination of immunoreactive trypsinogen (PPV = 4%, method accuracy = 99.2%) and thyroid stimulating hormone (PPV = 18% and method accuracy = 99.8%) by immunofluorometric

assays. These tests are routinely carried out in our hospitals for the first step detection of cystic fibrosis (CF) and congenital hypothyroidism using DBS. However, the protocol we apply for CF and congenital hypothyroidism screening requires a second step analysis for those samples that present indeterminate values (close to cutoff points). For CF detection, samples are directed to DNA analysis by mass spectrometry (Maldi-Tof), using a chip with 277

mutations. In the same fashion, a second step analysis based on the quantification by mass spectrometry of the enzymatic reaction products [25] could help to reduce false-positive rates in the screening for FD.

Lowering the cutoff level that we established for α -GalA may also help to reduce false-positive rates of the enzymatic screening, in case that the test is performed in male samples only. The cutoff value of enzymatic activity could have been overestimated in male samples, since it was determined in 2168 healthy newborns of both sexes.

On the other hand, performing enzymatic test in newborn females may help to the early identification of at least a percentage of the affected females. In our study, we detected a heterozygous subject with a new non-characterized variant of *GLA* (p.F18Y), as well as two newborn girls with GVUS. In the case that further studies confirm a pathogenic state of p.F18Y, the prevalence of FD in the whole population will be of 0.014% (1:7297; PPV of 2%, a method accuracy of 99.3%, a false-positive rate of 0.67%, and a 95% CI of 75–100), which are values similar to the ones obtained in male population. This suggests that the percentage of false negatives in our female population is not extremely high. Nonetheless, genetic sequencing is the only method that currently is efficient for a reliable detection of female patients and we have to be well aware that an activity above the cutoff does not exclude FD in females.

When considering newborn screening for FD, there are important issues to take into account. Given the refusal of ACHDNC to include FD in the RUSP, experts maintain an open position regarding NBS for FD or Gaucher disease, which meets favorable criteria in terms of frequency of the diseases and available diagnostic methods and therapies [26]. Even if the ambiguity regarding the prognosis of the subject with GVUS is an undesirable outcome in screening, the possibility to establish an early therapeutic protocol counts as a major pro in favor of neonatal FD screening, since the available treatments are more efficient when the therapy is started in the early symptomatic phase. We believe that the benefits of early diagnosis, especially in the case of positive subjects, cannot be underestimated; therefore, we suggest reconsidering the position adopted on FD screening by ACHDNC, based on the growing amount of data appointing to high frequency of *GLA* mutations in the population and the perspective of new therapeutic strategies. This paper largely discusses the characteristics of genetic modifications in order to discriminate between pathogenic mutations and GVUS and can help to develop adequate follow-up programs. Indeed, in order to support a change in the current policy, a follow-up of the subjects identified in pilot studies will be determinant and should be associated to a deeper functional characterization of the controversial variants, which includes transcription analysis and epigenetic data.

Conclusions

The estimated prevalence for FD classical phenotype in male newborns of Galicia is of 0.013%. These values, as well as the feasibility and efficacy of the proposed method (method accuracy = 99.12%, PPV = 1.47%), postulate FD as a candidate for systematic screening. However, further characterization of the frequently identified variants of *GLA* with uncertain clinical significance is necessary to establish appropriate protocols for patients' management.

Acknowledgements The authors acknowledge Francisco Barros-Angueira, from the Public Foundation of Genomic Medicine of Santiago de Compostela, for his contribution to the sequencing experiments. This studied was founded by the Spanish National Institute of Health-Instituto Carlos III/European Union-FEDER, grant no. P111-00842, to Ortolano S. and the Foundation for Enhancement and Enrichment of Life to Cristobal C.

Authors' contributions SO: performed analysis of genetic data, wrote paper, and revised it critically for important intellectual content. She also reviewed this final version so that it could be published and approved as submitted.

CC: substantially contributed to the conception and design of the protocol, collected data, and interpreted biochemical and genetic results. He also contributed in writing the first draft of the manuscript and approved the final version of the manuscript as submitted.

CMC: collected samples, analyzed data, and participated in drafting the paper. She approved the final version of the manuscript as submitted.

JVA: processed samples and performed sequencing experiments. He approved the final version of the manuscript as submitted.

OLS: collected samples and clinical history, contributed to the conception and design of the protocol, and participated in drafting the paper. She approved the final version of the manuscript as submitted.

MLC: collected samples, contributed to the conception and design of the protocol, and analyzed data. She approved the final version of the manuscript as submitted.

JRFL: collected samples, contributed to data analysis, and revised it critically for important intellectual content. She approved the final version of the manuscript as submitted.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest Saida Ortolano has collaborated in projects sponsored by the pharmaceutical company Shire Ibérica Human Genetic Therapies. She has also been invited to attend or give a conference by Shire Ibérica Human Genetic Therapies. Cristobal Colon and Maria L. Couce organized and participated in a meeting sponsored by Shire Ibérica Human Genetic Therapies.

Ethical approval The study has been approved by the Healthcare Ethics Committee of Santiago de Compostela University Hospital.

All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional and/or national research committee and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards.

Informed consent Legal tutors signed informed consent for all underage subjects participating in this study. All adults enrolled in the study to perform the family analysis also signed the informed consent.

Availability of data and material The datasets generated and/or analyzed during the current study are not publicly available to preserve privacy of the involved patients but are available from the first author or the corresponding author on reasonable request.

Funding This studied was founded by the Spanish National Institute of Health-Instituto Carlos III/EU-FEDER, grant no. P111-00842, to Ortolano S. and FEEL Foundation to Cristobal Colón.

Open Access This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made.

References

1. Gelb MH, Scott CR, Turecek F (2015) Newborn screening for lysosomal storage diseases. *Clin Chem* 61:335–346
2. Ortolano S, Vieitez I, Navarro C, Spuch C (2015) Treatment of lysosomal storage disease: recent patents and future strategies. *Recent Pat Endocr Metab Immune Drug Discovery* 8:9–25
3. Matern D, Gavrilov D, Oglesbee D, Raymond K, Rinaldo P, Tortorelli S (2015) Newborn screening for lysosomal storage disorders. *Semin Perinatol* 39:206–216
4. Ross LF (2012) Newborn screening for lysosomal storage diseases: an ethical and policy analysis. *Journal of Inherited Metabolic Diseases* 35:627–634
5. Alfadhel M, Sirrs S (2011) Enzyme replacement therapy for Fabry disease: some answers but more questions. *J Ther Clin Risk Manag* 7:69–82
6. Golan L, Goker-Alpan O, Holida M, Kantola I, Klopotoski M, Kuusisto J et al (2015) Evaluation of the efficacy and safety of three dosing regimens of agalsidase alfa enzyme replacement therapy in adults with Fabry disease. *J Drug Des Dev Ther* 9:3435–3444
7. Nakao S, Kodama C, Takenaka T, Tanaka A, Yasumoto Y, Yoshida A et al (2003) Fabry disease: detection of undiagnosed hemodialysis patients and identification of a “renal variant” phenotype. *Kidney Int* 64:801–807
8. Terryn W, Vanholder R, Hemelsoet D, Leroy BP, Van Biesen W, De Schoenmakere G et al (2013) Questioning the pathogenic role of the GLA p.Ala143Thr “mutation” in Fabry disease: implications for screening studies and ERT. *J Inherit Metab Dis* 8:101–108
9. Hopkins PV, Campbell C, Klug T, Rogers S, Rabum-Miller J, Kiesling J (2015) Lysosomal storage disorder screening implementation: findings from the first six months of full population pilot testing in Missouri. *J Pediatr* 166:172–177
10. Parenti G, Andria G, Valenzano KJ (2015) Pharmacological chaperone therapy: preclinical development, clinical translation and prospects for the treatment of lysosomal storage disorders. *Mol Ther* 23:1138–1148
11. Chamoles NA, Blanco M, Gaggioli D (2001) Fabry disease: enzymatic diagnosis in dried blood spots on filter paper. *Clin Chim Acta* 308:195–196
12. Shabbeer J, Yasuda M, Benson SD, Desnick RJ (2006) Fabry disease: identification of 50 novel alpha-galactosidase A mutations causing the classic phenotype and three-dimensional structural analysis of 29 missense mutations. *Human Genomics* 2:297–309
13. Human Gene Mutation Database <http://hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>, 09/01/2017
14. Meikle PJ, Hopwood JJ, Clague AE, Carey WF (1999) Prevalence of lysosomal storage disorders. *J Am Med Assoc* 281:249–254
15. Inoue T, Hattori K, Ihara K, Ishii A, Nakamura K, Hirose S (2013) Newborn screening for Fabry disease in Japan: prevalence and genotypes of Fabry disease in a pilot study. *J Hum Genet* 58:548–552
16. Lin HY, Chong KW, Hsu JH, Yu HC, Shih CC, Huang CH et al (2009) High incidence of the cardiac variant of Fabry disease revealed by newborn screening in the Taiwan Chinese population. *Circ Cardiovasc Genet* 2:450–456
17. Spada M, Pagliardini S, Yasuda M, Tukul T, Thiagarajan G, Sakuraba H et al (2006) High incidence of later-onset fabry disease revealed by newborn screening. *Am J Hum Genet* 79:31–40
18. van der Tol L, Smid BE, Poorthuis BJ, Biegstraaten M, Deprez RH, Linthorst GE et al (2014) Systematic review on screening for Fabry disease: prevalence of individuals with genetic variants of unknown significance. *J Med Genet* 51:1–9
19. Schiffmann R, Fuller M, Clarke LA, Aerts JM (2016) Is it Fabry disease? *Genet Med* 18(12):1181–1185
20. Froissart R, Guffon N, Vanier MT, Desnick RJ, Maire I (2003) Fabry disease: D313Y is an alpha-galactosidase A sequence variant that causes pseudodeficient activity in plasma. *Mol Genet Metab* 80:307–314
21. NCBI-SNPs Database- (<http://ncbi.nlm.nih.gov/snp>, 09/01/17)
22. Zeevi DA, Hakam-Spector E, Herskovitz Y, Beeri R, Elstein D, Altarescu G (2014) An intronic haplotype in alpha galactosidase A is associated with reduced mRNA expression in males with cryptogenic stroke. *Gene* 549:275–279
23. Gervas-Arruga J, Cebolla JJ, Irun P, Perez-Lopez J, Plaza L, Roche JC et al (2015) Increased glycolipid storage produced by the inheritance of a complex intronic haplotype in the alpha-galactosidase A gene (GLA). *BMC Genomics* 16:109–121
24. Scott CR, Elliott S, Buroker N, Thomas LI, Keutzer J, Glass M et al (2013) Identification of infants at risk for developing Fabry, Pompe, or mucopolysaccharidosis-I from newborn blood spots by tandem mass spectrometry. *J Pediatr* 163:498–503
25. Gelb M, Turecek F, Scott CR, Chamoles NA (2006) Direct multiplex assay of enzymes in dried blood spots by tandem mass spectrometry for the newborn screening of lysosomal storage disorders. *J Inherit Metab Dis* 29:397–404
26. Lisi EC, McCandless SE (2016) Newborn screening for lysosomal storage disorders: views of genetic healthcare providers. *J Genet Couns* 25:373–384

AUTORIZACIONES DE EMPLEO DE IMÁGENES EXTERNAS



Maria Ahn<maria.ahn@permanyer.com>

Lun 11/03/2019 9:52

Para: Cristina Melcon Crespo

Apreciada Cristina,

Encantada de saludarle.

Por medio de la presente autorizamos la utilización de la figura mencionada para su tesis doctoral, bajo las siguientes condiciones:

- Por favor citar el artículo donde aparece la figura original (añadiendo *modificada* o *adaptada* de XXXX....., con autorización de Publicaciones Permanyer)
- La concesión de esta autorización se limita al uso especificado en este email.

Saludos cordiales,

María



María S. Ahn, Ph.D

Departamento de Autores

P. Permanyer SL

Mallorca, 310

08037 Barcelona

Tel.: (+34) 932 080 894

E-mail: maria.ahn@permanyer.com

Aviso

Informamos que sus datos personales, que puedan constar en esta comunicación, están incorporados en un fichero responsabilidad de PUBLICIDAD PERMANYER, S.L. Su finalidad es gestionar la relación negocial e informarle de nuestros servicios. Si desea ejercitar los derechos de acceso, rectificación, cancelación u oposición, puede dirigirse por escrito a: Mallorca, 310, 08037 BARCELONA. Si usted no desea recibir más información sobre nuestros servicios, puede darse de baja en la siguiente dirección de correo electrónico: permanyer@permanyer.com. El contenido de este correo electrónico y sus anexos es estrictamente confidencial. En el caso de que usted no sea el destinatario y haya recibido este mensaje por error, agradeceríamos lo comunique inmediatamente al remitente, sin difundir, almacenar o copiar su contenido.

**ELSEVIER LICENSE
TERMS AND CONDITIONS**

Apr 01, 2019

This Agreement between cristina melcon ("You") and Elsevier ("Elsevier") consists of your license details and the terms and conditions provided by Elsevier and Copyright Clearance Center.

License Number	4558350248609
License date	Mar 29, 2019
Licensed Content Publisher	Elsevier
Licensed Content Publication	Journal of the Neurological Sciences
Licensed Content Title	Fabry's disease
Licensed Content Author	Rima El-Abassi,Divya Singhal,John D. England
Licensed Content Date	Sep 15, 2014
Licensed Content Volume	344
Licensed Content Issue	1-2
Licensed Content Pages	15
Start Page	5
End Page	19
Type of Use	reuse in a thesis/dissertation
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables/illustrations	1
Format	both print and electronic
Are you the author of this Elsevier article?	No
Will you be translating?	Yes, including English rights
Number of languages	1
Languages	Spain
Original figure numbers	Figure 1
Title of your thesis/dissertation	Implementacion de los métodos de diagnóstico de la enfermedad de Fabry
Expected completion date	Jul 2019
Estimated size (number of pages)	150
Requestor Location	cristina melcon estrada clara campoamor vigo, Pontevedra 36212 Spain Attn: cristina melcon
Publisher Tax ID	GB 494 6272 12
Billing Type	Invoice
Billing Address	cristina melcon estrada clara campoamor

**SPRINGER NATURE LICENSE
TERMS AND CONDITIONS**

Mar 08, 2019

This Agreement between cristina melcon ("You") and Springer Nature ("Springer Nature") consists of your license details and the terms and conditions provided by Springer Nature and Copyright Clearance Center.

License Number	4544371443946
License date	Mar 08, 2019
Licensed Content Publisher	Springer Nature
Licensed Content Publication	Genetics in Medicine
Licensed Content Title	Is it Fabry disease?
Licensed Content Author	Raphael Schiffmann, Maria Fuller, Lorne A. Clarke, Johannes M.F.G. Aerts
Licensed Content Date	May 19, 2016
Licensed Content Volume	18
Licensed Content Issue	12
Type of Use	Thesis/Dissertation
Requestor type	academic/university or research institute
Format	print and electronic
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables/illustrations	1
High-res required	no
Will you be translating?	yes, including original language
Number of languages	1
Circulation/distribution	<501
Author of this Springer Nature content	no
Title	Implementacion de los métodos de diagnóstico de la enfermedad de Fabry
Institution name	n/a
Expected presentation date	Jul 2019
Portions	Figure 1
Specific Languages	spanish
Requestor Location	cristina melcon estrada clara campoamor vigo, Pontevedra 36212 Spain Attn: cristina melcon
Billing Type	Invoice
Billing Address	cristina melcon estrada clara campoamor vigo, Spain 36212 Attn: cristina melcon

**ELSEVIER LICENSE
TERMS AND CONDITIONS**

Mar 08, 2019

This Agreement between cristina melcon ("You") and Elsevier ("Elsevier") consists of your license details and the terms and conditions provided by Elsevier and Copyright Clearance Center.

License Number	4544380236562
License date	Mar 08, 2019
Licensed Content Publisher	Elsevier
Licensed Content Publication	Molecular Genetics and Metabolism
Licensed Content Title	The management and treatment of children with Fabry disease: A United States-based perspective
Licensed Content Author	Robert J. Hopkin,John L. Jefferies,Dawn A. Laney,Victoria H. Lawson,Michael Mauer,Matthew R. Taylor,William R. Wilcox
Licensed Content Date	Feb 1, 2016
Licensed Content Volume	117
Licensed Content Issue	2
Licensed Content Pages	10
Start Page	104
End Page	113
Type of Use	reuse in a thesis/dissertation
Intended publisher of new work	other
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables/illustrations	1
Format	both print and electronic
Are you the author of this Elsevier article?	No
Will you be translating?	Yes, including English rights
Number of languages	1
Languages	spanish
Original figure numbers	Figure 1A
Title of your thesis/dissertation	Implementacion de los métodos de diagnóstico de la enfermedad de Fabry
Expected completion date	Jul 2019
Estimated size (number of pages)	150
Requestor Location	cristina melcon estrada clara campoamor vigo, Pontevedra 36212 Spain Attn: cristina melcon
Publisher Tax ID	GB 494 6272 12
Total	0,00 EUR

