

# Enfermedad de Fabry en Argentina

## *Fabry disease in Argentina*

## *Doença de Fabry na Argentina*

► Paula Adriana Rozenfeld<sup>1</sup>

---

<sup>1</sup> Bioquímica. Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata.  
Doctora de la Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata.  
IIFP (Instituto de Estudios Inmunológicos y Fisiopatológicos), Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas, UNLP y CONICET. Calle 47 y 115 (1900) La Plata, Provincia de Buenos Aires, Argentina.  
E-mail: paurozen@biol.unlp.edu.ar

### Resumen

La enfermedad de Fabry es una patología genética debida a la deficiencia de la enzima  $\alpha$ -galactosidasa A. En la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata se implementaron estudios de diagnóstico de enfermedades lisosomales y se comenzó por la Enfermedad de Fabry. Se llevó a cabo un estudio dirigido a la detección de pacientes Fabry no diagnosticados mediante un enfoque biomédico multidisciplinario. Se realizó una evaluación nefrológica de los pacientes argentinos detectados y un análisis de sus manifestaciones clínicas durante el tratamiento de reemplazo enzimático. Los pacientes tratados con agalsidasa alfa recibieron sus primeras infusiones en centros médicos, y luego la infusión fue domiciliaria. Los datos de los pacientes argentinos fueron registrados en la base de datos FOS, un registro internacional multicéntrico. Los estudios de investigación básica realizados mostraron la existencia de un estado proinflamatorio en células de pacientes Fabry, lo cual podría explicar parte de su fisiopatología. El abordaje de las enfermedades poco frecuentes no es sencillo, sobre todo ante la falta de políticas sanitarias de parte del Estado. Este trabajo permitió lograr múltiples objetivos: la difusión de la Enfermedad de Fabry en Argentina, mayor sospecha clínica en la comunidad médica, y mejor accesibilidad al diagnóstico, seguimiento y tratamiento para los pacientes.

**Palabras clave:** Enfermedad de Fabry \* Diagnóstico de enfermedades lisosomales \*globotriasilceramida

### Summary

*A Fabry disease is an X-linked lysosomal disorder that results from a deficiency of the lysosomal enzyme alpha-galactosidase A. The implementation of biochemical and genetic tests for lysosomal diseases was carried out in our institution, the School of Exact Sciences, Universidad Nacional de La Plata. A successful approach for the detection of Fabry patients in Argentina was developed by constituting an interdisciplinary group of professionals. A nephrological assessment of the Argentine patients detected was made and the clinical manifestations of Fabry patients were analysed and recorded in a FOS international registry. Patients received their enzyme replacement therapy, and the infusion was offered at home. Research studies carried out by our group showed the existence of a proinflammatory state in cells from Fabry patients, which could be related to the pathophysiology. Approaching*

**Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana**

Incorporada al Chemical Abstract Service.

Código bibliográfico: ABCLDL.

ISSN 0325-2957

ISSN 1851-6114 en línea

ISSN 1852-396X (CD-ROM)

*rare diseases is not easy, especially when there is a lack of State health care policies. This work led us to achieve objectives such as disseminate knowledge about the disease in our country, enhance clinical suspicion and improve accessibility to diagnosis and treatment for patients.*

**Keywords:** *Fabry disease \* lysosomal disorders \* diagnosis \* globotriaosylceramide*

## Resumo

*doença de Fabry é uma doença genética que resulta da deficiência da enzima  $\alpha$ -galactosidase A. Na Faculdade de Ciências Exatas da Universidade Nacional de La Plata foram implementados estudos de diagnóstico de doenças lisossomais e a primeira foi a Doença de Fabry. Realizou-se um estudo orientado à detecção de pacientes Fabry não diagnosticados mediante uma abordagem biomédica multidisciplinar. Foi feita uma avaliação nefrológica dos pacientes argentinos detectados e uma análise de suas manifestações clínicas durante o tratamento de reposição enzimática. Os pacientes tratados com agalsidase alfa receberam suas primeiras infusões em centros médicos, e depois a infusão foi domiciliar. Os dados dos pacientes argentinos se registraram na base de dados FOS, um registro internacional multicêntrico. Estudos de pesquisa básica realizados mostraram a existência de um estado pró-inflamatório em células de pacientes Fabry, o que poderia explicar parte de sua fisiopatologia. A abordagem das doenças pouco frequentes não é simples, principalmente diante da falta de políticas sanitárias de parte do Estado. Este trabalho permitiu alcançar objetivos múltiplos: a difusão da Doença de Fabry na Argentina, maior suspeita clínica na comunidade médica, e melhor acessibilidade ao diagnóstico, seguimento e tratamento para os pacientes.*

**Palavras-chave:** *Doença de Fabry \* Diagnóstico de doenças lisossomais \* globotriasilceramida*

## Introducción

La enfermedad de Fabry (OMIM 301500) pertenece al grupo de las enfermedades lisosomales, que son un grupo de patologías poco frecuentes, de origen genético, debidas a mutaciones patogénicas en genes que codifican para proteínas asociadas a la función de los lisosomas. La mayoría de ellas se deben a deficiencias en enzimas hidrolíticas lisosomales, aunque también pueden deberse a alteraciones en proteínas de la membrana lisosomal y a aquellas asociadas a la síntesis de las proteínas lisosomales (1) (Tabla I).

La enfermedad de Fabry es una patología genética de herencia ligada al cromosoma X, que se debe a la deficiencia de la actividad de la enzima lisosomal  $\alpha$ -galactosidasa A ( $\alpha$ -D-galactósido galactohidrolasa, EC 3.2.1.22;  $\alpha$ -Gal A) (2). La función de esta enzima consiste en la degradación de su sustrato, la globotriaosilceramida (Gal- $\alpha$ 1-4Gal- $\beta$ 1-4Glc b 1-1Cer; Gb3) en los lisosomas de las células de diferentes tejidos del cuerpo (3). Inicialmente fue descrita como angioqueratoma corporis difusum en 1898. Esta deficiencia se debe a mutaciones en el gen GLA, localizado en el cromosoma X (región Xq22.1), que codifica para dicha enzima. El gen GLA se encuentra en una secuencia de 12 kb, y está formado por 7 exones. El ADN complementario está compuesto de 1397 pares de bases, y codifica para una proteína de 429 aminoácidos, que incluye al péptido señal de 31 residuos. Este polipéptido precursor es modificado post-traduccionalmente en el complejo de Golgi con residuos de hidratos de carbono. La proteína madu-

ra es dirigida a los lisosomas, tiene 398 residuos y se encuentra como dímero.

La herencia de la enfermedad es ligada al X, con un patrón que no es ni recesivo ni dominante. Los varones con una mutación patogénica en el único gen GLA (varones hemicigóticos) transmiten la enfermedad a todas sus hijas mujeres pero no a sus hijos varones. Por otro lado, las mujeres heterocigóticas pueden transmitir la enfermedad con un 50% de riesgo tanto a sus hijos varones como mujeres.

La penetrancia de la Enfermedad de Fabry en mujeres heterocigóticas es considerablemente alta: alrededor del 70% de las pacientes presenta alguna manifestación clínica de la enfermedad (4). La incidencia es de 1/40.000 a 1/117.000 varones nacidos vivos. Sin embargo, un reporte reciente de un estudio italiano establece una incidencia de 1/3100 (5).

Las manifestaciones clínicas de esta enfermedad comienzan en la niñez, y se caracterizan por la aparición de acroparestesias, dolor gastrointestinal, hipohidrosis/anhidrosis, microalbuminuria y angioqueratomas aislados (6). Alrededor de los 20 años de edad, se observan angioqueratomas agrupados en zonas específicas (ombligo, "traje de baño", mucosas), proteinuria, ataques de fiebre, edemas, intolerancia al calor y ejercicio, manifestaciones auditivas y vestibulares. Una forma de opacidad corneal, córnea *verticillata*, es un hallazgo oftalmológico común. Con la progresión de la enfermedad, alrededor de la cuarta década de la vida, se afectan los órganos blanco que provocan la muerte, reduciendo así la expectativa de vida: insuficiencia renal, hipertrofia ventricular cardíaca y accidentes cerebrovasculares (7).

Tabla I. Clasificación funcional de las enfermedades lisosomales

Mecanismo	Ejemplos de enfermedades	Proteína deficiente	Gen
<b>I-DEFICIENCIAS DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA</b>			
	Gaucher	Glucocerebrosidasa	GBA
	Fabry	$\alpha$ -galactosidasa A	GLA
	MPS I	$\alpha$ -iduronidasa	IDUA
	MPS II	Iduronato-2-sulfatasa	IDS
	MPS IIIA MPS IIIB MPS IIIC MPS IIID	Heparansulfamidasa $\alpha$ -N-acetil glucosaminidasa acetilCoA alfa-glucosaminidasa N-acetiltransferase N-acetilglucosamina-6-sulfato sulfatasa	SGSH NAGLU HGSNAT NGS
	MPS IVA MPS IVB	galactosa-6-sulfato sulfatasa $\beta$ -galactosidasa	GALNS GLB1
	MPS VI	arilsulfatasa B	ARSB
	MPS VII	$\beta$ -D-glucuronidasa	GUSB
	MPS IX	Hialuronidasa	HYAL1
	Tay Sachs	$\beta$ -hexosaminidasa A (alfa-beta)	HEXA
	Sandhoff	$\beta$ -hexosaminidasa total	HEXT
	Niemann Pick AB	esfingomielinasa	SMPD1
<b>II- DEFICIENCIAS ENZIMÁTICAS MÚLTIPLES</b>			
	Deficiencia de sulfatasas múltiple	Factor generador de formilglucina	SUMF-1
	mucopolipidosis II/III	Fosfotransferasa	GNPTAB
<b>III- DEFECTO EN PROTEÍNAS DE TRANSPORTE DE LA MEMBRANA LISOSOMAL</b>			
	Niemann Pick C	NPC1 o NPC2	NPC1-NPC2
	Cistinosis	Cistinosina	CTNS
<b>IV- DEFICIENCIA DEL SISTEMA ENDOLISOSOMAL</b>			
	Mucopolipidosis IV	Mucopolipina	MCOLN1

En la actualidad, los avances de la ingeniería genética han hecho posible el desarrollo de un tratamiento específico: la terapia de reemplazo enzimático, que consiste en la infusión intravenosa de la enzima  $\alpha$ -Gal A recombinante, cada 2 semanas (8). Existen dos productos comercialmente disponibles desde el año 2003: Agalsidasa alfa (Replagal, Shire, EE.UU.) y Agalsidasa beta (Fabrazyme, Genzyme, Sanofi, EE.UU.) que están basadas en preparaciones enzimáticas producidas a partir de fibroblastos humanos y en la línea celular CHO, respectivamente.

El objetivo del presente trabajo fue realizar una revisión de lo realizado en el laboratorio IIFP, Facultad de Ciencias Exactas, UNLP-CONICET, desde el inicio de la línea de investigación sobre Enfermedad de Fabry en el año 2003 hasta la actualidad. En cada descripción del trabajo realizado se referencia la cita bibliográfica, donde existe la información completa y detallada de cada estudio realizado.

## Materiales y Métodos

### PACIENTES

Se incluyeron individuos controles así como también pacientes varones y mujeres con Enfermedad de Fabry,

los cuales se encontraban en seguimiento por médicos de AADELFA que es una asociación médica cuyo objetivo es el estudio y difusión de las enfermedades lisosomales en Argentina. El protocolo fue aprobado por el comité científico de AADELFA de acuerdo a la Declaración de Helsinki de 1995. El estudio fue explicado a los voluntarios, quienes firmaron el consentimiento informado para participar del mismo.

Se incluyeron 34 varones hemocigotas y 41 mujeres heterocigotas con Enfermedad de Fabry. De ellos, 20 mujeres y 26 varones se encontraban bajo tratamiento de reemplazo enzimático con agalsidasa alfa (Replagal, Shire, EE.UU.).

### DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE ALFA-GALACTOSIDASA A

La actividad enzimática se determinó en muestras de sangre seca en papel de filtro S&S903, y homogenatos de leucocitos de sangre periférica y fibroblastos.

Para ello, se colocó la muestra del paciente en pocillos de microplaca negra, y se le agregaron 0,07 mL de la mezcla de reacción que contenía 3,57M de 4-metilumbeliferil- $\alpha$ -D-galactopiranosido (Glycosynth, Cheshire, Inglaterra) y 0,07 M de N-acetilgalactosamina (Toronto Research Chemicals Inc., North York, Ontario, Canadá) en bu-

ffer 0,15 M de acetato pH 4,5. Se incubó 8 h a 37 °C, y se agregaron 0,18 mL de etilendiamina 1 M pH 11,4. Se midió la emisión de fluorescencia a 450 nm, con excitación a 360 nm.

#### ANÁLISIS DE GB3 EN MUESTRAS DE PACIENTES FABRY

Se colectaron orinas de 24 hs de los pacientes Fabry y de los controles. Se centrifugaron y se tomaron alícuotas de 200 mL, de cuyo sedimento se aislaron los glicolípidos neutros. Para eso, se le agregaron 15 mL de cloroformo:metanol 2:1 y se incubó toda la noche a temperatura ambiente. Se agregaron 4 mL de agua y se centrifugó. La fase inferior se secó, se le agregó 1 mL de metanol y 0,1 mL de NaOH 1M y se incubó toda la noche a 37 °C. Se agregaron 2 mL de cloroformo y 0,5 mL de agua, y se centrifugó. La fase inferior se secó. Luego se le agregaron 0,1 mL de *buffer* acetato 0,15 M pH 4,5, taurocolato de sodio 0,046M y 0,01 mL de agalsidasa alfa (Replagal, Shire, EE.UU) 1mg/mL, y se incubó toda la noche a 37 °C. Se impregnaron papeles de filtro S&S 903 con esta suspensión, los cuales se utilizaron para la determinación de la galactosa liberada por la reacción enzimática, utilizando un método fluorométrico con galactosa dehidrogenasa, diaforasa y resazurina. Los resultados se expresaron como nmol de Gb3 por orina de 24 h.

La linealidad y recuperación de Gb3 se realizó agregando cantidades conocidas de Gb3 a sedimentos urinarios de controles normales. Se determinaron los límites de detección y cuantificación como la media +3DS y 5DS, respectivamente, a partir de orina de 10 controles normales. La precisión dentro y entre corridas se ensayó midiendo 3 muestras 3 veces en la misma corrida y en diferentes corridas, respectivamente.

Para control de los resultados obtenidos por este método, se analizó el contenido de Gb3 las mismas muestras mediante un método validado de HPLC, que fue realizado en el laboratorio central de Shire (Lexington, EE.UU).

## Resultados

#### DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

El diagnóstico de la Enfermedad de Fabry se realiza mediante la demostración de una actividad enzimática deficiente en leucocitos aislados de sangre periférica o cultivo de fibroblastos (9). Como estudio de tamizaje puede realizarse el dosaje de la enzima en gotas de sangre seca en papel de filtro. Este estudio no se realiza en laboratorios de análisis clínicos de rutina, se requiere laboratorio especializado con personal entrenado y experimentado en el estudio de este tipo de patologías. Hacia inicios de los años 2000 existían en Argentina sólo dos centros que ofrecían este estudio (Laboratorio

de Neuroquímica Dr N.A. Chamoles y Centro de Metabolopatías Congénitas Hospital de Niños de Córdoba, CEMECO). A partir de una necesidad de la sociedad, se decidió iniciar la implementación de estudios de diagnóstico de enfermedades lisosomales en la Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata. El primer esfuerzo se centró en la implementación del dosaje enzimático de  $\alpha$ -Gal A para el diagnóstico de la enfermedad de Fabry.

La determinación de la actividad de la enzima  $\alpha$ -Gal A se realizó en muestras de sangre seca en papel de filtro, de acuerdo al método publicado por el Dr Chamoles (10). La confirmación diagnóstica se realizó mediante dosaje de la actividad en leucocitos aislados de sangre periférica, según el método de Desnick (11). Se determinó el intervalo de referencia de actividad de esta enzima en leucocitos, fibroblastos y papel de filtro, utilizando 100 muestras de individuos controles sanos (12). Se determinaron los parámetros analíticos del ensayo utilizando muestras de pacientes previamente diagnosticados y de individuos controles. La sensibilidad se determinó como el cociente entre verdaderos positivos sobre el total de muestras de enfermos. La especificidad se determinó como el cociente entre verdaderos negativos sobre el total de muestras de controles sanos. La sensibilidad y especificidad fueron del 100% para los varones, permitiendo utilizar este ensayo como diagnóstico confirmatorio para sexo masculino. En mujeres heterocigotas, los valores de actividad enzimática pueden ser variables, desde valores bajos a normales, haciendo que este ensayo no resulte de utilidad.

Dado que es una enfermedad genética, se decidió desarrollar también el estudio genético molecular. Las mutaciones que desencadenan esta enfermedad son privadas, implicando que cada familia tiene una mutación diferente y que no existen mutaciones más frecuentes (13). Las mutaciones en el gen *GLA* pueden ser de diferente tipo: deleciones completas del gen o exones, inserciones, duplicaciones o mutaciones puntuales que provocan cambio de sentido o sin sentido, y que pueden localizarse en cualquiera de los 7 exones. Por ello para el estudio genético molecular se parte en primer lugar de la secuenciación completa de los 7 exones y sus regiones intrónicas adyacentes. Así se pueden localizar la mayoría de las mutaciones patogénicas, que se encuentran en las regiones codificantes o sitios de empalme del ARN mensajero. El estudio genético se realiza para demostrar la presencia de la mutación patogénica en el gen *GLA* del varón hemiciigótico cuyo diagnóstico se demostró por dosaje de la enzima. La búsqueda de esta mutación hallada en las mujeres familiares resulta de utilidad para el diagnóstico confirmatorio en las mismas. En conclusión, para el diagnóstico de mujeres heterocigóticas Fabry se requiere el estudio genético.

#### PROYECTO EXITOSO DE DETECCIÓN DE PACIENTES FABRY EN ARGENTINA

Los protocolos fueron realizados de acuerdo a la Declaración de Helsinki, 1995. La naturaleza y objetivos del estudio fueron explicados a los pacientes, quienes dieron su consentimiento antes de ingresar como participantes del estudio.

La enfermedad de Fabry se encuentra subdiagnosticada en Argentina, así como en el resto del mundo. Esto se debe a que es una enfermedad poco frecuente, poco tenida en cuenta en el diagnóstico diferencial por parte de la comunidad médica, con síntomas inespecíficos y multisistémicos que comienzan insidiosamente desde la niñez. El subdiagnóstico es algo común dentro de las enfermedades poco frecuentes. Ante esta situación, se conformó la asociación sin fines de lucro AADELFA ([www.aadelfa.com.ar](http://www.aadelfa.com.ar)), con el fin de difundir la enfermedad en la comunidad médica, acercar la posibilidad del diagnóstico a los pacientes y colaborar y asesorar con el seguimiento clínico y tratamiento de los pacientes diagnosticados. Existían descripciones aisladas de casos de Fabry en Argentina, pero no se había realizado ningún proyecto de detección sistemática de pacientes. Es así que se llevó a cabo un estudio de tamizaje dirigido a la detección de pacientes Fabry no diagnosticados, mediante un enfoque biomédico multidisciplinario, estudiando a los pacientes desde el punto de vista bioquímico y médico evaluando la afectación de los órganos blanco. La estrategia comenzó mediante la comunicación y difusión de las características de la Enfermedad de Fabry a médicos del país. Las manifestaciones clínicas típicas de la enfermedad de Fabry son:

- acroparestesias: dolor neuropático (sensación de quemazón, hormigueo) agudo o crónico,
- angioqueratomas: pápulas rojo-violáceas que no desaparecen a la vitropresión,
- hipohidrosis/anhidrosis: reducción o ausencia de transpiración,
- dolor gastrointestinal,
- fiebre recurrente,
- linfedema,
- microalbuminuria/proteinuria,
- disminución de filtración glomerular,
- hipertrofia del ventrículo izquierdo concéntrica y progresiva,
- accidentes cerebrovasculares,
- hipoacusia.

Los médicos que sospecharon la enfermedad en sus pacientes enviaron muestras de sangre al laboratorio. A partir de la detección de un nuevo caso, se procedió a construir el árbol genealógico y a estudiar a los familiares en riesgo de padecer la enfermedad.

En el primer período de estudio (años 2003-2004), a partir de 121 muestras derivadas con sospecha clí-

nica, se detectaron 6 nuevos pacientes varones, casos índices de 6 familias afectadas por esta enfermedad. Esos casos índices fueron remitidos por nefrólogos y dermatólogos. Se logró identificar la mutación en cada uno de ellos: p.Leu243Trp, p.Asp155His, p.Leu415Pro, p.Cys94Tyr, p.Leu191Pro y p.R227X. El trabajo ante una enfermedad genética como esta, consistió en brindar información a todos los familiares sobre la existencia de la enfermedad en su familia. El abordaje familiar se realizó mediante una asistente social. Se construyeron los árboles genealógicos y se les ofreció el estudio de diagnóstico a los familiares en riesgo de padecer la enfermedad. A partir de este tamizaje familiar se diagnosticaron 64 pacientes más, 29 varones y 35 mujeres. La edad promedio al diagnóstico fue de 26,9 años (rango 6-51) para los varones y 31,4 (rango 5-70) para las mujeres (14).

Se llevó a cabo la evaluación clínica de los pacientes Fabry detectados en Argentina, a través de los especialistas referentes médicos de AADELFA. De esta forma se conoció la situación de los pacientes afectados. Se encontró que la edad de inicio de los síntomas era muy inferior a la edad promedio al diagnóstico, indicando un gran retraso en la obtención del mismo. Las manifestaciones más frecuentes fueron el dolor neuropático, la hipohidrosis, la córnea verticillata y la proteinuria (15).

#### ANÁLISIS DE GB3 EN MUESTRAS DE PACIENTES FABRY

Los biomarcadores son moléculas que se encuentran en los fluidos biológicos de pacientes afectados y resultan de utilidad como complemento diagnóstico, indicador de severidad de la patología y/o para seguimiento de tratamiento. Para la enfermedad de Fabry, el primer biomarcador evaluado fue el Gb3. Para su cuantificación en general se utiliza cromatografía HPLC o espectrometría de masas, requiriendo equipamiento costoso y que generalmente se encuentra en laboratorios de investigación. Dada la inaccesibilidad a dicho equipamiento, se desarrolló un método sencillo que permitiera cuantificar Gb3 en muestras de pacientes, y evaluar su utilidad para complemento al diagnóstico y como seguimiento de tratamiento. El método consistió en el aislamiento de glicolípidos neutros del sedimento urinario de muestras de orina de 24 horas de los pacientes, y la posterior incubación del mismo con la enzima específica para Gb3  $\alpha$ -galactosidasa A recombinante (Replagal, SHIRE, USA). La enzima hidroliza el Gb3 presente en el aislado liberando galactosa. La medida de galactosa permitió calcular la cantidad de Gb3 de la muestra. El método mostró buena recuperación del Gb3 y alta comparabilidad con el método de HPLC ampliamente validado. La aplicación del método a muestras de pacientes mostró que los varones Fabry presentaban valores significativamente aumentados comparados con los

individuos controles, y las mujeres heterocigotas valores intermedios (Figura 1). Y la evaluación de pacientes en tratamiento de reemplazo enzimático permitió demostrar la reducción en los niveles de Gb3 (16).

Otra forma de analizar la presencia de Gb3 es mediante la demostración de su presencia en biopsias de tejidos de pacientes, lo cual resultaría de utilidad como sospecha diagnóstica en mujeres heterocigotas. En colaboración con el oftalmólogo del grupo AADELFA, se decidió estudiar si se podía detectar la presencia de Gb3 en biopsias de conjuntiva ocular mediante inmunofluorescencia, utilizando un anticuerpo específico para Gb3. Para ello, mediante una cirugía ambulatoria que no requería preparación especial y utilizando anestesia local, se procedió a la extracción de las biopsias de pacientes. Se incluyeron biopsias de controles sanos, obtenidas por el oftalmólogo para otros estudios. Las biopsias fueron analizadas mediante tres métodos: microscopía óptica, microscopía electrónica e inmunofluorescencia. El análisis por microscopía óptica de las muestras teñidas con azul de toluidina mostró la presencia de vacuolización en células endoteliales de la pared de vasos sanguíneos conjuntivales, células perivasculares, estromales y epiteliales. A su vez, mostraron tinción positiva con PAS y Sudan Black. La microscopía electrónica reveló la presencia de los típicos cuerpos lamelares intracitoplásmicos. La utilización de la inmunofluorescencia resultó en una sensibilidad del 100%, revelando la presencia de Gb3 en las muestras de todos los pacientes Fabry, en las mismas células con depósitos localizados por microscopía óptica (17) (Figura 2).

El Gb3 ha demostrado cierta utilidad y su presencia se ha detectado en niveles elevados en pacientes con la enfermedad de Fabry clásica. Sin embargo, en la actuali-

dad, se están detectando casos de Fabry con formas variantes. Estas formas variantes son de inicio más tardío, carecen de las manifestaciones clínicas más típicas de la enfermedad (como angioqueratomas, dolor neuropático, hipohidrosis y cornea verticillata), y se caracterizan por presentar únicamente alteraciones en los órganos blanco, como riñón y corazón. En estas formas y en mujeres los niveles de Gb3 pueden ser normales, y así su uso está declinando. Esto llevó a la búsqueda de otros biomarcadores. De esta forma, se detectaron aumentos en niveles del liso-Gb3, un derivado del Gb3. El liso-Gb3 mejoró la sensibilidad, pero aún no es lo suficiente. Por otro lado no correlaciona adecuadamente con el nivel de severidad de la enfermedad ni con las mejoras asociadas al tratamiento. En la actualidad, no existe un biomarcador que refleje todos estos aspectos, y se están haciendo esfuerzos de investigación básica tratando de identificar nuevas moléculas (18)(19).

#### TRATAMIENTO DE REEMPLAZO ENZIMÁTICO EN PACIENTES FABRY ARGENTINOS

El único tratamiento específico disponible comercialmente es el reemplazo enzimático, que consiste en la administración intravenosa de la enzima recombinante humana. Existen dos productos aprobados, agalsidasa alfa producida en fibroblastos humanos y agalsidasa beta que es generada en células CHO. Los reportes bibliográficos muestran efectos positivos con ambos productos (20). Esta terapia mejora la calidad de vida de los pacientes, disminuyendo el dolor, mejorando la sudoración, estabilizando la función renal y cardíaca. El riñón es uno de los órganos blanco de la enfermedad, y su función progresivamente va disminuyendo.

	NC	M	M + ERT	F	F + ERT
Mean	19,0	1120,5	417,8	184,9	110,2
SD	3,2	845,8	408,0	109,4	95,2
n	42	8	26	21	20

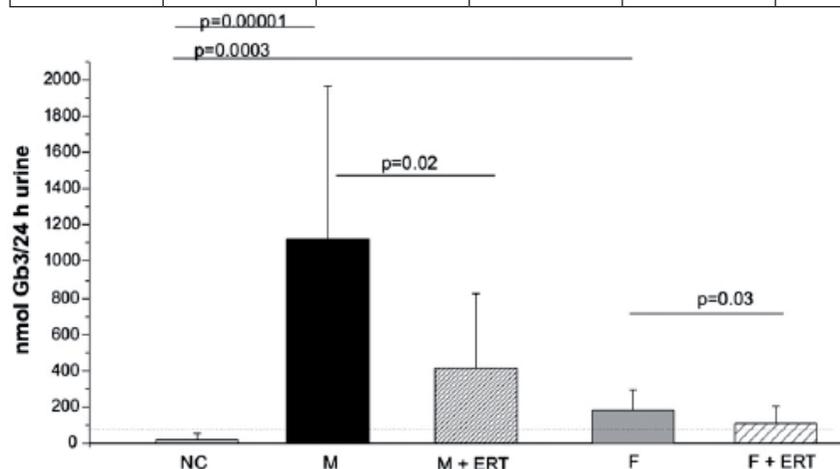


Figura 1. Valores de Gb3 de controles normales (NC), varones Fabry (M) y mujeres Fabry (F), con y sin tratamiento (ERT).

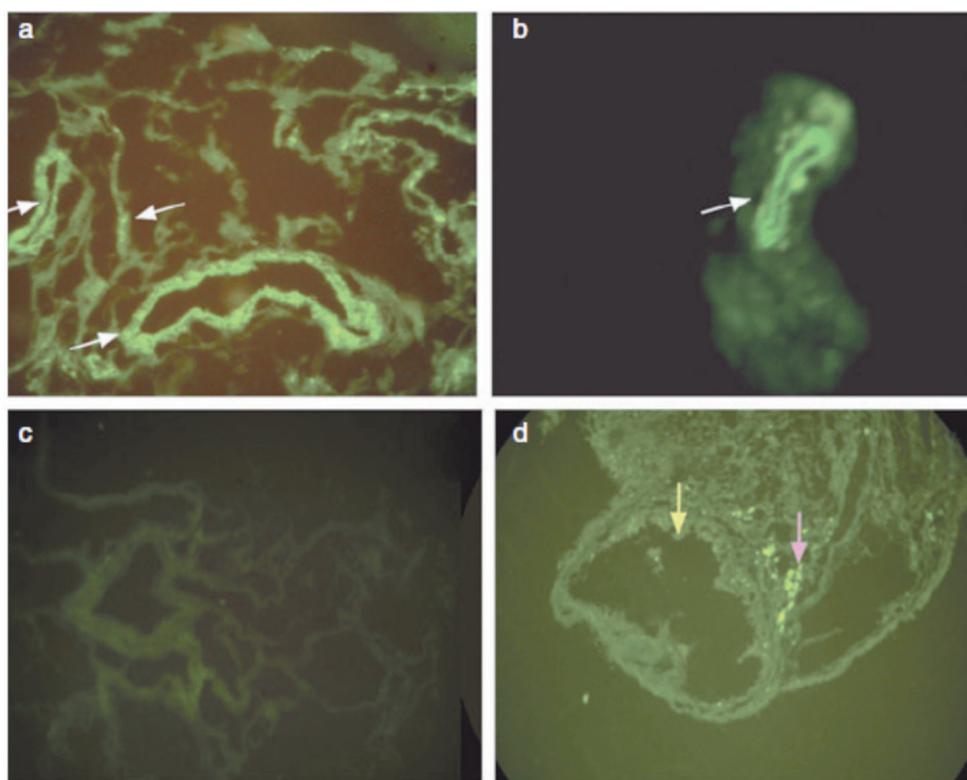


Figura 2. Inmunofluorescencia directa con un anticuerpo monoclonal específico de Gb3 en biopsias de conjuntiva ocular. A) Varon Fabry, b) mujer Fabry, c) control normal, d) varon Fabry en tratamiento de reemplazo enzimático. Con flechas se señala la tinción positiva para Gb3.

Los pacientes fueron evaluados desde el punto de vista nefrológico mediante la determinación de proteinuria y análisis de la función renal mediante *clearance* de creatinina o requerimiento dialítico. Se encontró que la proteinuria era la manifestación más frecuente, seguida por la insuficiencia renal (21) (Tabla II). Los pacientes tratados con agalsidasa alfa por médicos de AADELFA recibieron sus primeras infusiones en centros médicos, y luego pasaron a un sistema de infusión domiciliaria, que les permitió una mejor adherencia al tratamiento con menor disturbio de su vida cotidiana (22).

Tabla II. Presencia o ausencia de proteinuria en los pacientes Fabry (n=44)

Proteinuria >1 g	Proteinuria entre 0,15 y 1 g	Ausencia de proteinuria
11	21	12

REGISTRO DE PACIENTES CON ENFERMEDAD DE FABRY

Existen registros internacionales multicéntricos para ingresar información sobre pacientes con enfermedades raras con el objetivo de conocer todos los aspectos de la enfermedad en un gran número de pacientes. Existen dos registros para enfermedad de Fabry, el Fabry Registry y el

Registro multicéntrico longitudinal de Enfermedad de Fabry “Fabry Outcome Survey” (FOS). Los datos de los pacientes diagnosticados por AADELFA han sido ingresados en la base de datos FOS, desde el año 2003, contando con un seguimiento a largo plazo de los pacientes en tratamiento. La evaluación de los datos de los pacientes argentinos en tratamiento por al menos 7 años (n=63) que se registraron en FOS mostró que la función renal se mantuvo estable, en los grupos de pacientes que habían iniciado su tratamiento en los 3 diferentes estadios de función renal al inicio del tratamiento (estadios I, II y III). El análisis de la masa ventricular cardíaca estudiada por ecocardiograma mostró que no hubo aumento de la misma, y se mantenía sin cambios significativos. En conclusión, los pacientes Fabry de Argentina tratados con agalsidasa alfa mostraron estabilización de la enfermedad cardíaca y renal (datos aún no publicados).

ALTERACIONES DEL SISTEMA INMUNE EN CÉLULAS DE PACIENTES FABRY

Se realizaron estudios a nivel de investigación básica con células mononucleares de pacientes Fabry, con un abordaje inmunológico.

Se estudió por citometría de flujo los niveles de las diferentes subpoblaciones de células del sistema inmune. Para ello, se partió de 50 µL de sangre periférica a las

que se agregaron los anticuerpos específicos para marcadores de linaje: CD3, CD4, CD8, CD14, CD56+CD16, CD19, Lin1-, HLA-DR, y se incubó a 4 °C durante 30 minutos. Se realizó la lisis de los glóbulos rojos. Se lavó con solución fisiológica. Las células se analizaron en un citómetro FACScalibur (Becton Dickinson, Mountain View, CA, EE.UU.). Se encontraron niveles reducidos de monocitos y células dendríticas en sangre de pacientes Fabry, mientras que la cantidad de linfocitos T y B se vio aumentada con respecto a los controles. También se detectó alteraciones en la expresión de moléculas asociadas a un estado proinflamatorio, como el CD31 (23).

Se estudió la presencia de los siguientes autoanticuerpos en suero de pacientes Fabry mediante ELISA: antígeno nuclear extraíble (ENA), ADN doble cadena, anticardiolipina y antifosfatidilserina. Se estudió, además, la presencia de anticoagulante lúpico. El 57% de las muestras de pacientes Fabry mostró la presencia de al menos un autoanticuerpo. Dichos autoanticuerpos eran más frecuentes en varones que en mujeres, al contrario de lo que se observa en población general (24).

Una anomalía muy frecuente en todas las enfermedades lisosomales es la presencia de un estado proinflamatorio, con aumentos en niveles de apoptosis y producción de citoquinas proinflamatorias (25). Por ello, se decidió estudiar esta característica en células de pacientes Fabry. Nuestro estudio reveló un aumento de apoptosis mediada por la vía intrínseca de activación de caspasas, que era iniciado por la acumulación de Gb3, y que se reducía en pacientes en tratamiento de reemplazo enzimático (26).

Se estudió la expresión de las citoquinas proinflamatorias TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-1 $\alpha$  mediante PCR en tiempo real y la producción de las mismas citoquinas en sobrenadantes de cultivo de células mononucleares de pacientes mediante ELISA de captura. La expresión y secreción de las citoquinas proinflamatorias TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  por parte de células de pacientes Fabry se vio aumentada, y era mediada por células dendríticas y monocitos. Este efecto era inducido por el Gb3 a través del receptor tipo Toll TLR4 (27). Este estado proinflamatorio podría ser la base para explicar la compleja fisiopatología asociada a esta enfermedad.

## Discusión y Conclusiones

El abordaje de las enfermedades poco frecuentes no es sencillo, sobre todo ante la falta de políticas sanitarias de parte del estado. Requiere la voluntad y la asociación de profesionales de diferentes ramas, incluyendo las biomédicas, pero no restringidas a las mismas, como ser aquellos asociados a la comunicación, a lo social y legal. Nuestro proyecto se inició en el 2003, y gracias a este trabajo mancomunado y colaborativo logramos varios de nuestros principales objetivos:

- La difusión de la Enfermedad de Fabry en nuestro país
- Mayor sospecha clínica en la comunidad médica
- La mejor accesibilidad al diagnóstico para los pacientes
- Sistema para ofrecer seguimiento y tratamiento a los pacientes.

Esto se ve reflejado en la publicación de la Guía Argentina para el diagnóstico, seguimiento y tratamiento de la enfermedad de Fabry (26).

## CORRESPONDENCIA

DRA. PAULA ROZENFELD

Investigadora Independiente CONICET

DIEL - IIFP (Fac de Cs Exactas - UNLP - CONICET)

Calle 47 y 115 (1900) La Plata, Argentina

## Referencias bibliográficas

1. Platt FM, Boland B, Van der Spoel AC. The cell biology of disease: Lysosomal storage disorders. The cellular impact of lysosomal dysfunction. *J Cell Biol* 2012 ; 199 (5): 723-34.
2. Brady RO, Gal AE, Bradley RM, Martensson E, Warshaw AL, Laster L. Enzymatic defect in Fabry disease. *N Engl J Med* 1967; 276 (21): 1163-7.
3. Kint JA. Fabry disease.  $\alpha$ -Galactosidase deficiency. *Science* 1970; 167 (3922): 1268-9.
4. Rozenfeld P. Fabry disease: Treatment and diagnosis. *IUBMB Life* 2009; 61 (11): 1043-50.
5. 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. *Am J Hum Genet* 2006; 79 (1): 31-40.
6. Ries M, Gupta S, Moore DF, Sachdev V, Quirk JM, Murray GJ, *et al.* Pediatric Fabry disease. *Pediatrics* 2005 Mar; 115 (3): e344-55.
7. Mehta A, Beck M, Elliott P, Giugliani R, Linhart A, Sunder-Plassmann G, *et al.* Enzyme replacement therapy with agalsidase alfa in patients with Fabry's disease: an analysis of registry data. *Lancet* 2009; 374 (9706): 1986-96.
8. Schiffmann R, Kopp JB, Austin HA, Sabnis S, Moore DF, Weibel T, *et al.* Enzyme replacement therapy in Fabry disease: a randomized controlled trial. *JAMA* 2001 J; 285 (21): 2743-????????????????
9. Filocamo M, Morrone A. Lysosomal storage disorders: molecular basis and laboratory testing. *Hum Genomics* 2011; 5 (3): 156-69.
10. Chamoles N, Blanco M, Gaggioli D. Fabry disease: enzymatic diagnosis in dried blood spots on filter paper. *Clin Chim Acta* 2001: 308 (1-2): 195-6.
11. Desnick RJ, Allen YK, Desnick S, Raman MK, Bernlohr RW, *et al.* Fabry's disease: enzymatic diagnosis of hemy-

- zigotes and heterozygotes.  $\alpha$ -Galactosidase A activities in plasma, serum, urine and leukocytes. *J Lab Clin Med* 1973; 81 (2): 157-71.
12. Ceci R, de Francesco PN, Mucci JM, Cancelarich LN, Fossati CA, Rozenfeld PA. Reliability of enzyme assays in dried blood spots for diagnosis of 4 lysosomal storage disorders. *Adv Biol Chem* 2011; 1: 58-64.
  13. Eng CM, Desnick RJ. Molecular basis of Fabry disease: mutations and polymorphisms in the human  $\alpha$ -galactosidase A gene. *Hum Mutat* 1994; 3 (2): 103-11.
  14. Rozenfeld PA, Tarabuso A, Ebner R, Ramallo G, Fossati CA. A successful approach for the detection of Fabry patients in Argentina. *Clinical Genetics* 2006; 69 (4): 344-8.
  15. Reisin R, Doxastaquis G, Kisinovsky I, Cáceres G, Tarabuso A, Neumann P, *et al.* Evaluación de pacientes con enfermedad de Fabry en la Argentina. *Medicina (Buenos Aires)* 2010; 70: 37-43.
  16. Rozenfeld PA, De Francesco PN, Borrajo GJC, Ceci R, Fossati CA. An easy and sensitive method for determination of globotriaosylceramide (Gb3) from urinary sediment: utility for Fabry disease diagnosis and treatment monitoring. *Clin Chim Acta* 2009; 403 (1-2): 194-7.
  17. Rozenfeld PA, Croxatto O, Ebner R, Fossati CA. Immunofluorescence detection of Gb3 deposits in conjunctival biopsies of hemizygote and heterozygote patients with Fabry's disease. *Clin Exper Ophtalmol* 2006; 34 (7): 689-94.
  18. Aerts JM, Groener JE, Kuiper S, Donker-Koopman WE, Strijland A, Ottenhoff R, *et al.* Elevated globotriaosylsphingosine is a hallmark of Fabry disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105 (8): 2812-7.
  19. Boutin M, Auray-Blais C. Multiplex tandem mass spectrometry analysis of novel plasma lyso-Gb<sub>3</sub>-related analogues in Fabry disease. *Anal Chem* 2014; 86 (7): 3476-83.
  20. Sirrs SM, Bichet DG, Casey R, Clarke JT, Lemoine K, Doucette S, *et al.* Outcomes of patients treated through the Canadian Fabry disease initiative. *Mol Genet Metab*; 111 (4): 499-506.
  21. Neumann P, Rozenfeld P. Manifestaciones nefrológicas de pacientes con Enfermedad de Fabry en Argentina. *Nefrología, Trasplante e Hipertensión* 2007; 27 (3): 99-102.
  22. Kisinovsky I, Cáceres G, Coronel C, Reisin R. Home infusion program for Fabry disease: experience with agalsidase alfa in Argentina. *Medicina* 2013; 73 (1): 31-4
  23. Rozenfeld P, Agriello E, De Francesco PN, Martínez P, Fossati CA De Leukocyte perturbation associated with Fabry disease. *J Inher Metab Dis* 2009; 32 Suppl 1: 67-77.
  24. Martínez P, Aggio M, Rozenfeld PA. High incidence of autoantibodies in Fabry disease patients. *J Inher Metab Dis* 2007; 24: 365-9.
  25. Cox TM, Cachón-González MB. The cellular pathology of lysosomal diseases. *J. Pathol* 2012; 226 (2): 241-54.
  26. de Francesco PN, Mucci JM, Ceci R, Fossati CA, Rozenfeld PA. Higher apoptotic state in Fabry disease peripheral blood mononuclear cells. Effect of globotriaosylceramide. *Mol Genet Metab* 2011; 104 (3): 319-24.
  27. de Francesco PN, Mucci JM, Ceci R, Fossati CA, Rozenfeld PA Fabry disease peripheral blood immune cells release inflammatory cytokines: role of globotriaosylceramide. *Mol Genet Metab* 2013; 109 (1): 93-9.
  28. Neumann P, Antongiovanni N, Fainboim A, Kisinovsky I, *et al.* Guidelines for diagnosis, monitoring and treatment of Fabry disease. Grupo Argentino de Diagnóstico y Tratamiento de la enfermedad de Fabry (Consenso de Médicos de AADELFA y GADYTEF). *Medicina (B Aires)*. 2013;73 (5): 482-94.