



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI**

**SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE BIOMEDICHE**

*Direttore della Scuola: Prof. Andrea Fausto Piana*

**INDIRIZZO IN NEUROSCIENZE**

**XXVIII CICLO**

**RECENTI AVANZAMENTI NELLA PATOFISIOLOGIA  
E DIAGNOSTICA NELLA MALATTIA DI FABRY**

***Direttore:***

Prof. Andrea Fausto Piana

***Tutor:***

Prof. GianPietro Sechi

***Tesi di dottorato di:***

Dott. Laura Fancellu

**Anno Accademico 2014 – 2015**

*A mio padre*

# Indice

<b>1. Introduzione</b>	<b>3</b>
<b>2. La malattia di Fabry</b>	<b>6</b>
<b>3. Studio elettrofisiologico: Fabry e stimolazione magnetica transcranica</b>	<b>26</b>
<b>4. Studio biochimico: Fabry e glicosaminoglicani</b>	<b>42</b>
<b>5. Conclusioni</b>	<b>56</b>
<b>6. Bibliografia</b>	<b>60</b>

# 1. Introduzione

L'interesse per la componente genetica della suscettibilità a malattie complesse sta assumendo sempre più importanza nella medicina moderna, in quanto si sta mettendo in evidenza il ruolo sia di specifici geni che di alcuni polimorfismi genetici relativamente comuni, ma che se associati tra loro e combinati con specifiche componenti ambientali, possono elevare notevolmente il rischio di sviluppare patologie diffuse nella società industriale, quali le malattie cerebro-cardiovascolari.

A tale scopo sono stati avviati, di recente, in Europa e negli Stati Uniti, Canada ed Australia, diversi screening di popolazione a rischio, per studiare la prevalenza di disturbi monogenici come la malattia di Fabry.

La malattia di Fabry (MF) è una malattia lisosomiale, dove è presente un difetto del metabolismo dei glicosfingolipidi, dovuto a ridotta o assente attività dell'enzima lisosomiale alfa-galattosidasi A, per la mutazione del gene GLA (Xq22). La diminuzione dell'attività enzimatica provoca l'accumulo di glicosfingolipidi neutri, principalmente globotriaosilceramide (Gb3), all'interno dei lisosomi, e ciò a sua volta scatena una cascata di eventi cellulari.

Questa patologia ereditaria, multisistemica e progressiva, è caratterizzata da specifici segni neurologici, renali, cardiovascolari, oculari e cutanei.

Il quadro clinico comprende un ampio spettro di sintomi, che varia da forme lievi-moderate, monosintomatiche, ai casi più gravi nei maschi emizigoti con forma classica. Questi pazienti possono presentare tutti i segni tipici della malattia a livello neurologico (dolore), cerebrovascolare (ictus, episodi ischemici transitori), renale (proteinuria, insufficienza renale), cardiovascolare (cardiomiopatia, aritmia), cutaneo (angiocheratoma). Le femmine possono mostrare sintomi da lievi a gravi.

Con l'età, si verifica un deterioramento progressivo dei diversi sistemi che può provocare insufficienza d'organo. L'insufficienza renale terminale e le complicazioni cerebrovascolari o cardiovascolari potenzialmente fatali limitano la prospettiva di vita dei pazienti di entrambi i sessi, con una riduzione di circa 20-25 anni, rispetto alla popolazione generale.

La diagnosi è sempre più complicata dalla presenza di varianti atipiche a esordio tardivo, descritte negli ultimi anni.

Da circa dieci anni è disponibile una terapia specifica (terapia di sostituzione enzimatica con alfa-galattosidasi A ingegnerizzata in vitro), la cui efficacia a lungo termine è in fase di studio

per entrambi i farmaci disponibili. I primi risultati sono promettenti. Non è chiaro se il farmaco abbia un effetto diretto sul sistema nervoso centrale, ma sembra che non sia in grado di attraversare la barriera ematoencefalica (BEE).

Nel nostro centro da anni ci occupiamo dei pazienti affetti da MF presenti in Sardegna, avendo effettuato le prime diagnosi nell'ambito dello screening per tale patologia fra i pazienti con ictus giovanile e nei relativi screening familiari.

I pazienti seguiti nel nostro centro hanno fenotipo variabile, sia classico con coinvolgimento multiorgano che con fenotipo parziale, paucisintomatico.

Con l'obiettivo di fornire il supporto medico-scientifico e assistenziale necessario ai malati, abbiamo cercato di studiare alcuni aspetti della malattia, anche non prettamente neurologici.

Recenti lavori scientifici, inclusi alcuni del nostro gruppo, stanno portando così a una conoscenza sempre maggiore della fisiopatologia della malattia e delle potenziali indagini biochimiche e strumentali, utili per determinare la diagnosi e per il follow up dei pazienti.

I risultati di questi studi possono aiutare parzialmente a risolvere bisogni medici di questa malattia rara e progressiva, e mirano a migliorare la qualità di vita rendendola sovrapponibile o vicina a quella di individui della popolazione generale.

In modo particolare in un primo studio abbiamo indagato il possibile coinvolgimento delle cellule piramidali e i cambiamenti nella eccitabilità della corteccia motoria nei pazienti con MF utilizzando la stimolazione magnetica transcranica.

Nell'ipotesi che si possa creare uno squilibrio neurotrasmettitoriale per potenziale accumulo di glicosfingolipidi anche a livello del SNC o comunque per effetto indiretto del danno vascolare abbiamo misurato la attività elettrica nella corteccia motoria. L'analisi è stata effettuata mediante protocolli predeterminati di stimolazione magnetica transcranica ed ha dimostrato un incremento nelle eccitabilità corticale, indicativa di un disequilibrio elettrofisiologico con coinvolgimento dei circuiti eccitatori glutammatergici nei nostri pazienti.

Inoltre abbiamo condotto un secondo studio, di tipo biochimico per valutare se l'escrezione dei proteoglicani e glicosaminoglicani urinari potesse rappresentare un marcatore utile nel monitoraggio della progressione del danno renale nella MF.

Dati recenti di letteratura indicano che oltre al metabolismo dei glicosfingolipidi, nella MF sono implicate anche altre vie biochimiche ed è crescente il numero di biomarcatori potenzialmente utilizzabili per la diagnostica ed il follow-up dei pazienti.

In particolare abbiamo riscontrato una aumentata escrezione urinaria di glicosaminoglicani, del proteoglicano biconina (anche detto Urinary Trypsin Inhibitor, UTI), in soggetti affetti da MF e con danno renale.

Questi due studi preliminari, che hanno consentito la pubblicazione di due articoli (Ortu et al., 2013; Lapedda et al., 2013) hanno mostrato aspetti elettrofisiologici e biochimici peculiari che andrebbero indagati approfonditamente, su un campione più ampio. Questi dati sono potenzialmente utili sia a fini diagnostici, che prognostici, e anche per determinare la reale efficacia della terapia.

Nei successivi capitoli sarà innanzitutto esposta la natura eziopatogenetica della malattia e saranno enunciate le principali manifestazioni cliniche, nonché principi di diagnosi e terapia e saranno infine spiegati nel dettaglio i due studi effettuati presso il nostro centro.

La malattia di Fabry deve essere diagnosticata il più precocemente possibile, se possibile prima della insorgenza di danno strutturale irreversibile.

Ulteriori studi sulla fisiopatologia ovviamente sono necessari per cercare di venire incontro alle necessità dei pazienti e dei clinici coinvolti nel trattamento di questa patologia rara e complessa.

## 2. La Malattia di Fabry

### 2.1 Concetti generali

La malattia di Fabry è un disordine genetico progressivo X-linked del metabolismo dei glicosfingolipidi dovuto all'assente o insufficiente azione dell'enzima lisosomiale alfa-galattosidasi A (Anderson, 1898; Fabry, 1898).

Il deposito di glicosfingolipidi a livello lisosomiale gioca un importante ruolo nel creare disfunzione cellulare e nell'indurre la patologia micro vascolare (Sweeley et al., 1963; Brady et al., 1967). Il deposito lisosomiale avviene in molteplici tipi cellulari, incluse le cellule endoteliali, renali (podociti, cellule tubulari, glomerulari, mesangiali), cardiache e dei nervi (Kint, 1970; Desnik et al., 2001).

Tuttavia, diversamente da altre malattie lisosomiali, la maggior parte dei pazienti rimane per lungo tempo asintomatica durante i primi anni di vita e talvolta decenni (Neufeld, 1991).

La malattia di Fabry è un disordine panetnico e l'incidenza annuale riportata è di 1 su 100000 può portare a sottostimare la reale prevalenza della malattia. L'azione insufficiente dell'enzima alfa-galattosidasi A porta ad un progressivo accumulo di globotriaosilceramide a livello lisosomiale, e ciò porta ad un meccanismo a cascata di eventi cellulari (Lucke et al., 2004; Das et al., 2009; Park et al., 2010; Shen et al., 2008; Chevrier et al., 2010).

La dimostrazione di un marcato deficit di alfa-galattosidasi A è diagnostico di malattia di Fabry.

I maschi emizigoti, portatori della forma classica, con totale carenza enzimatica, possono sviluppare tutte le manifestazioni tipiche: neurologiche (dolore), cutanee (angiocheratoma), renali (proteinuria, insufficienza renale), cardiache (cardiomiopatia, aritmia), cocleovestibolari e cerebrovascolari (attacchi ischemici transitori e ictus).

Le donne eterozigoti possono invece manifestare sintomi con un livello di gravità variabile, da lievi a severi.

L'analisi enzimatica può occasionalmente aiutare a indagare gli eterozigoti ma è spesso un'indagine non conclusiva per il processo di inattivazione casuale della X, per cui per le donne è sempre necessario effettuare l'analisi genetica. Nell'infanzia, altre possibili cause di dolore acrale devono essere tenute in considerazione, quali i dolori di crescita e l'artrite reumatoide (Hopjkin et al., 2008).

La diagnosi prenatale è disponibile tramite determinazione dell'attività enzimatica o test genetico nei villi coriali o su cellule del liquido amniotico.

L'esistenza di varianti atipiche e la disponibilità di una specifica terapia rendono necessaria e allo stesso tempo ancor più complessa la consulenza genetica. Con l'età si sviluppa un progressivo danno agli organi e sistemi vitali. Le complicanze renali, cardiache e cerebrovascolari limitano la prospettiva di vita dei maschi e delle donne non trattate di 20 e 10 anni rispettivamente, se confrontate con la popolazione generale.

Una terapia enzimatica sostitutiva (ERT: enzyme replacement therapy) specifica per la malattia di Fabry, è stata introdotta recentemente e l'outcome a lungo termine di tale trattamento è tutt'ora oggetto di studio (Schiffmann et al., 2009; MacDermot et al., 2001).

Il trattamento basale, sintomatico, consiste nel trattamento del dolore con analgesici, la protezione della funzionalità renale con ACE inibitori e agenti selettivi di blocco dei recettori dell'angiotensina. Per i pazienti nello stadio finale della patologia vengono inoltre effettuate la dialisi e il trapianto renale.

Vi è una crescente evidenza che la terapia sostitutiva a lungo termine può rallentare la progressione della malattia e la necessità di sviluppare terapie nuove dovrebbe essere enfatizzata così come l'importanza di sviluppare una formulazione orale (Metha et al., 2010).

## **2.2 Epidemiologia**

La malattia di Fabry appartiene ad un gruppo di almeno 50 distinti disordini correlati alla biochimica lisosomiale, geneticamente determinati.

È un disordine panetnico ed ubiquitario, ma per la sua caratteristica di malattia rara è difficile determinare accuratamente la sua frequenza.

L'incidenza riportata nella popolazione generale, che varia da 117000 (Poortius et al., 1999) a 476000 (Meikle et al., 1999), può grandemente sottostimare la reale prevalenza.

Screening su neonati hanno rilevato una frequenza inaspettatamente più alta della patologia in Italia (1:3100) (Spada et al., 2006) ed hanno identificato una frequenza maggiore nei maschi in Taiwan (1:1500). Di questi ultimi, 86% con la mutazione IVS4+919G>A, una mutazione precedentemente trovata nel fenotipo cardiaco ad esordio clinico tardivo.

Una mutazione intronica IVS4+919G<A è stata inoltre trovata in un certo numero di pazienti adulti del Taiwan cinese con cardiomiopatia ipertrofica (Hwu et al., 2009).

## **2.3 Descrizione clinica**

### **2.3.1 Segni e sintomi precoci: malattia di Fabry nell'infanzia**

Un precoce danno neuronale coinvolge le piccole fibre nervose del sistema nervoso periferico somatico (Dutsh et al., 2002) e autonomo (Cable et al., 1982) con esordio sintomatologico generalmente più precoce nei maschi rispetto alle femmine (Ramaswami et al., 2006). Il



dolore è lamentato dal 60-80% dei bimbi classicamente affetti. Due tipi di dolore sono stati descritti: crisi episodiche dette anche “crisi di Fabry”, caratterizzate da dolore urente, agonico, localizzato alle estremità e con irradiazione agli arti e in altre parti del corpo, e un tipo di dolore cronico, caratterizzato da dolore urente e parestesie formicolari

Le crisi di Fabry possono essere precipitate dalla febbre, dall’esercizio fisico, stress e cambiamenti repentini della temperatura. Quando le crisi sono scatenate o accompagnate dalla febbre, i pazienti generalmente hanno una elevata velocità di eritrosedimentazione. In conseguenza del dolore la qualità di vita di questi pazienti è assai limitata (Miners et al., 2002; Cole et al., 2007).

Altre possibili cause di dolore che possono essere indagate sono l’artrite reumatoide, la febbre reumatica, la sindrome di Raynaud, il lupus eritematoso sistemico e i “dolori di crescita”, questi ultimi frequente misdiagnosi in pazienti con la malattia di Fabry.

Il dolore può affievolirsi con l’andare degli anni ed è importante una accurata anamnesi per mettere in evidenza una storia precedente di acro parestesie durante la prima visita di pazienti adulti di nuova diagnosi (Naleschinski et al., 2009).

Altri segni precoci con comparsa nell’infanzia, ma che rimangono solitamente presenti anche nella vita adulta sono i disturbi gastrointestinali (comune ma sottostimata manifestazione della malattia) (Hoffmann et al., 2009).

I pazienti possono lamentare dolore addominale, spesso postprandiale, diarrea, nausea e vomito, che sono una causa frequente di anoressia.

Questa sintomatologia può essere correlata alla deposizione di globotriaosilceramide (GB3) nei gangli autonomici dei vasi intestinali e mesenterici (Eng et al., 2006). In diagnostica differenziale è importante considerare la sindrome del colon irritabile.

L’assenza di sudorazione (anidrosi) o la riduzione della stessa (ipoidrosi) con una ridotta impedenza cutanea è un problema importante per i pazienti e può causare riduzione della termodispersione con intolleranza a esercizio fisico anche moderato (Orteu et al., 2007; Germain, 2002).

La più visibile caratteristica clinica della malattia è l’angiocheratoma (lesione cutanea) e grappoli di piccole lesioni cutanee rilevate con colorazione variabile da rosso vivo a vinaccia. Visibili preminentemente nella cosiddetta zona del “costume da bagno”: andranno esaminati quindi l’inguine e la radice delle cosce, lo scroto. Spesso si hanno lesioni periombelicali ma anche a livello della mucosa orale.

Istologicamente le lesioni sono rappresentate da piccoli angiomi superficiali causati dal progressivo cumulativo danno delle cellule endoteliali della cute, con dilatazione vasale nel

derma che incrementa di numero e misura con l'età e può comparire singolarmente o in gruppi (Germain, 2002).

Sono inoltre state descritte le teleangectasie e l'edema sottocutaneo.

Modificazioni nella struttura corneale sono riscontrate frequentemente ("cornea verticillata"), raramente in presenza di sintomi visivi (diagnosi può essere incidentale o se ricercata anche per altre motivazioni), può essere visualizzata facilmente tramite l'esame con lampada a fessura.

Spesso viene osservato un decorso tortuoso dei vasi.

Il tinnito può essere un sintomo precoce e la perdita di acuità uditiva è stata spesso riportata nei bambini.

Molto frequentemente sono state riportate la fatica cronica e la difficoltà nell'acquisire peso, specialmente durante l'adolescenza. Sono stati inoltre riportati casi di priapismo.

Nonostante l'assenza di disfunzioni di organi maggiori, questi sintomi, da soli o in combinazione fra loro, possono causare una significativa limitazione nelle performance fisiche, scolastiche e sociali dei bimbi.

Segni precoci di interessamento cardiaco e anomalie cerebrovascolari possono essere presenti durante l'adolescenza in entrambi i sessi.

Segni del coinvolgimento del nodo del seno e del sistema di conduzione (accorciamento del tratto PR, aritmie, disfunzioni valvolari minori) sono state riportate (Kampmann et al., 2008). Sebbene rare, evidenze di danno microvascolare ischemico cerebrale possono essere presenti alla RM in giovane età (Cabrera Salazar et al., 2005).

Il corso naturale del danno renale nel bambino o nell'adolescente non è ancora ben compreso. Segni indicativi di una precoce, insidiosa progressione di danno renale includono la microalbuminuria e la proteinuria, sviluppandosi sia nelle fasi precoci che nella seconda decade di vita (Gubler et al., 1978).

Modificazioni potenzialmente irreversibili a glomeruli, tubuli interstiziali e strutture vascolari prima della prima comparsa della microalbuminuria può essere osservata nelle biopsie renali di bambini (Tondel et al., 2008).

Sono stati descritti quadri di glomerulosclerosi focale e scomparsa dei processi podocitici.

Il declino della frazione di filtrazione glomerulare non è comune nell'adolescenza ma può essere riscontrato nell'adolescenza (Germain, 2002).

Gli studi di funzionalità renale effettuati nei bambini affetti da malattia di Fabry si sono basati su frazione di filtrazione glomerulare stimata sulla base dei valori di creatinina. La classica formula di Schwartz, ampiamente utilizzata, sostanzialmente sovrastima il tasso di filtrazione glomerulare (GFR), mentre la nuova formula (Schwartz et al., 2009), mostra buoni risultati,

con una sovrastima di 5.3 ml/min/1.73m<sup>2</sup>, essendo solo poco superiore alla formula di Counahan-Barratt. Tali formule devono essere utilizzate nell'attività routinaria ma qualora ci siano pazienti nei quali cambiamenti del GFR possono dare un'indicazione nel regime terapeutico, sono necessari metodi più precisi (Tondel et al, 2008).

### **2.3.2 Coinvolgimento renale**

Come molti altri aspetti della malattia, il coinvolgimento renale aumenta con gli anni. Nei pazienti affetti dalla forma classica lesioni renali si formano per la deposizione di Gb3 nelle cellule endoteliali, glomerulari e mesangiali e nei podociti. E' stata descritta la scomparsa dei podociti. Il deposito glicosfingolipidico avviene anche nell'epitelio dell'ansa di Henle, nei tubuli distali e nelle cellule endoteliali e muscolari lisce delle arteriole renali (Fogo et al., 2010).

Il danno renale spesso inizia con microalbuminuria e proteinuria nella seconda e terza decade di vita che, come nella nefropatia diabetica, si ritiene possa direttamente contribuire alla progressione della nefropatia di Fabry.

Con l'avanzare dell'età, la proteinuria peggiora (Fervenza et al., 1999). Si sviluppa isostenuria, accompagnata da alterazioni nel riassorbimento tubulare, secrezione ed escrezione. Inizialmente una compensazione glomerulare, con l'iperfiltrazione, può mascherare il danno crescente ma, una volta danneggiato un numero critico di nefroni, la funzionalità renale andrà progressivamente a peggiorare.

Dalla terza alla quinta decade di vita, generalmente si sviluppa l'azotemia. In questo stadio, fibrosi, sclerosi e atrofia dei tubuli portano all'insufficienza renale che generalmente intercorre nei maschi attorno alla quarta-quinta decade di vita (Froissart et al., 2007).

Gli aspetti nefrologici della malattia sono quelli che maggiormente contribuiscono alla morbilità e mortalità. La progressione fino all'insufficienza renale terminale è la prima causa di morte nei pazienti maschi non trattati, e la morte avviene per condizione uremica, sebbene sia praticata la dialisi e/o il trapianto renale (Shiffmann et al., 2009).

La valutazione della funzione renale che dovrebbe essere attuata in tutti i pazienti include la creatinina sierica, la cistatina C, la stima del GFR, le proteine totali, la microalbuminuria e la sodiuria. Nelle fasi precoci è stata stabilita l'utilità degli "spot" urinari per la ratio proteine urinarie/creatinina e la stima del GFR con l'equazione della modificazione della dieta con il danno renale (MDRD). L'assessment della proteinuria e del GFR può essere usato per stadiare il danno renale cronico come descritto nelle linee guida Kidney Disease Outcome Quality Initiative (K/DOQI CCKD) (Eng et al., 2006).

La biopsia renale può essere utile all'esame basale e in pazienti con presentazione atipica, inclusa la ripetuta biopsia nel caso di una progressione sotto terapia.

L'escrezione urinaria è fortemente associata con la progressione renale della malattia in entrambi i sessi (Wanner et al., 2010).

### **2.3.3 Coinvolgimento Cardiaco**

Nel 40-60% dei pazienti si sviluppano ipertrofia ventricolare sinistra, aritmia, angina e dispnea (Shiffmann et al., 2009; Linhart et al., 2000; Kampmann et al., 2002).

E aritmie e difetti della normale variabilità di frequenza cardiaca si sviluppano per il coinvolgimento del nodo del seno, del sistema di conduzione e dal disequilibrio fra tono simpatico e parasimpatico.

La disfunzione diastolica e l'ipertrofia concentrica del ventricolo sinistro sono manifestazioni potenziali della malattia. Gli uomini sono generalmente più affetti delle donne.

L'ischemia miocardica e l'infarto possono svilupparsi nel contesto della compromessa funzione coronarica.

Con l'età si sviluppa una fibrosi miocardica progressiva con le componenti interstiziale e di sostituzione. Quella di sostituzione inizia nella parete postero-lateralee nel miocardio centrale. Nelle fasi terminali la fibrosi ha sostituito il tessuto cardiaco (fibrosi trasmurale) e gradualmente riduce la funzione cardiaca fino ad arrivare allo stadio di uno scompenso cardiaco congestizio.

I cambiamenti strutturali del ventricolo sinistro sono frequenti nei pazienti con la malattia di Fabry e possono essere dimostrate usando l'ecocardiografia o la Risonanza magnetica cardiaca (Germain, 2010).

È particolarmente importante la misura dello spessore del setto poiché la parete posteriore con l'età si assottiglia. L'ipertrofia concentrica è stata riportata come il più comune cambiamento strutturale a livello cardiologico della malattia di Fabry.

Nonostante tali modificazioni morfologiche, comunque, la funzione sistolica appare per lo più conservata se misurata con metodiche tradizionali.

La cardiomiopatia è caratterizzata da ridotte contrazione miocardica e velocità di rilassamento tissutale, talvolta visibili prima dello sviluppo della ipertrofia vera e propria.

L'imaging ecodoppler tissutale può portare ad una diagnosi preclinica di Fabry (Pieroni et al., 2004).

L'ipertrofia ventricolare destra con normale grandezza della camera e conservata funzione sistolica ma compromessa funzione diastolica rappresenta una tipica modificazione del ventricolo destro nella malattia di Fabry.

Due terzi dei pazienti con ipertrofia del ventricolo sinistro la presentano anche nel destro. Vi è correlazione fra ipertrofia ventricolare destra spessore del ventricolo destro, età e MASS INDEX del ventricolo sinistro.

In un altro studio, il grado di coinvolgimento ventricolare veniva inoltre posto in correlazione con lo stadio di compromissione del ventricolo sinistro (Niemann et al., 2010).

Il coinvolgimento del ventricolo destro è dunque comune ed evolve nella disfunzione diastolica severa. Ciò può spiegare come pazienti con funzione ventricolare sinistra conservata possano sviluppare caratteristiche cliniche come una ridotta capacità di praticare esercizio fisico, organomegalia e linfedema.

Cambiamenti del tracciato con anomalie elettrocardiografiche sono frequenti ed includono cambiamenti nella ripolarizzazione correlati al LVH o al rimodellamento, un sottoslivellamento del tratto ST e una inversione della T.

Altre modificazioni comprendono un intervallo PR corto ( $<0,12$  sec) (Yokoyama et al., 1987) dovuto ad una onda P corta, allargamento del complesso QRS e un prolungato intervallo QT, tachicardia sopraventricolare intermittente, blocco del nodo AV, bundle branch block e aritmie.

L'Holter ECG delle 24 ore è utile e raccomandato nello studio basale e durante il follow-up durante la terapia enzimatica sostitutiva.

Le manifestazioni cardiache osservate nei pazienti con la forma classica sono descritte anche nei pazienti con la variante cardiaca (Von Scheidt et al., 1991).

Per quanto riguarda il coinvolgimento valvolare, nonostante studi abbiano riportato una elevata incidenza di prolasso della mitrale, questo dato non è stato confermato da studi più recenti.

Il coinvolgimento coronarico è presente, con rilevazione della riserva di perfusione miocardica significativamente ridotta nei pazienti affetti da malattia di Fabry (Kalliosky et al., 2005).

La capacità di praticare esercizio fisico è notevolmente ridotta se confrontata con la popolazione sana.

I pazienti hanno spesso disfunzioni autonome anche se non hanno segni evidenti di disregolazione ortostatica.

La patologia è associata con un incrementato rischio di sviluppare una dilatazione della radice dell'arco aortico nei maschi.

Tale reperto è stato descritto in 24% di 71 maschi emizigoti ed è stata associata statisticamente con la presenza di una arteria basilare dolico ectasica (Germain, 2010).

### 2.3.4 Lesioni cerebrovascolari

I caratteristici segni di neuropatia periferica della malattia di Fabry sono spesso seguiti da complicazioni cerebrovascolari e disfunzioni disautonomiche nell'età adulta. Alcune delle più gravi manifestazioni neurologiche sono causate dalle lesioni cerebrovascolari, come risultato di un coinvolgimento dei piccoli vasi (Fellgiebel et al., 2006; Sims et al., 2009).

Il coinvolgimento cerebrovascolare può portare ad una grande varietà di segni e sintomi, che variano da moderati a severi, includendo mal di testa, vertigine e nausea, attacchi ischemici transitori, ictus ischemici (Mitsias et al., 1996; Clavelou et al., 2006) e più raramente la demenza vascolare (Mendez et al., 1997; Okeda et al., 2008). Utilizzando dati dal Fabry Registry, la prevalenza degli ictus nella malattia di Fabry è stata stimata essere attorno al 6,9% nei maschi e 4,3% nelle femmine, molto superiore alla popolazione generale.

L'età media del primo stroke era 39 anni per gli uomini e 46 per le donne e l'ictus può rappresentare il primo evento della patologia.

Vi è una elevata prevalenza di ipertensione, malattia cardiaca e renale nei pazienti che hanno avuto un'ictus nel contesto della malattia di Fabry. Dati da entrambi i registri "Fabry Registry" e "Fabry Outcome Survey" (FOS) hanno mostrato che la maggioranza degli ictus sono dovuti a patologia dei piccoli vasi.

Una arteriopatia dilatativa della circolazione vertebrobasilare è stata inoltre documentata in più studi (Fellgiebel et al., 2009). La formazione di trombi può essere aumentata per il processo di adesione dei neutrofili e monociti alle pareti endoteliali (De Graba et al., 2000) o a cambiamenti della perfusione regionale cerebrale (iperperfusione) (Moore et al., 2001, Moore et al., 2002; Schiffmann, 2009).

Livelli sierici di mieloperossidasi sono stati rilevati come predittori del rischio di eventi vascolopatia-correlati nei maschi affetti dalla patologia (Kaneski et al., 2006).

Fra le diverse possibilità per indagare un eventuale coinvolgimento del sistema nervoso centrale nella patologia in questione includiamo la risonanza magnetica, il doppler transcranico (TCD) (Hilz et al., 2004), La spettroscopia RM, la tomografia ad emissione di positroni (PET) e il diffusion tensor imaging (Fellgiebel et al., 2007).

Le lesioni della sostanza bianca possono essere singole, multiple o confluenti alla RM (Fazekas et al., 1993; Ginsberg et al., 2006; Tedeschi et al., 1999).

La RM encefalica può mostrare lesioni della sostanza bianca periventricolare, microbleeds, infarti corticali e infarti profondi lacunari sia della sostanza bianca che della grigia (Germain, 2010).

Alcuni pazienti hanno una meningite asettica.

L'iperintensità del pulvinar nelle immagini T1-pesate è un comune reperto nei pazienti Fabry, come a riflettere la presenza di calcificazioni in tale sede.

Recenti dati suggeriscono che il pulvinar sia un segno altamente specifico per tale patologia, distintivo e peculiare (Burlina et al., 2008), e che sia più frequente nei maschi con cardiomiopatia e danno renale severo.

In uno studio pilota, la RM encefalica è stata effettuata in una coorte di 44 pazienti Fabry di sesso maschile consecutivi e in 7 di sesso femminile. La malformazione di Chiari tipo I è stata individuata in 6 individui (3 maschi e 3 donne).

Se l'associazione sia incidentale o meno, saranno eventuali ulteriori studi a definirlo, ma la malformazione di Chiari potrebbe spiegare episodi di cefalea frequentemente lamentati dai pazienti con la MF, e dovrebbe comunque essere esclusa in tutti i pazienti Fabry .

Una valutazione neurologica completa è essenziale prima dell'inizio della terapia sostitutiva, per evidenziare l'estensione e la gravità della malattia, così come uno studio completo di neuroimaging. L'esame clinico include una RM encefalo comprendente sequenze T1, T2, Flair e una angio-RM per escludere vasculopatia cerebrale.

Alle volte tale studio può portare ad evidenziare un quadro completo di manifestazioni cerebrovascolari (lesioni della sostanza bianca, ictus, dolico ectasia della basilare) e del pulvinar sign (Fancellu et al., 2010).

Il neurologo ha un ruolo fondamentale nella ricerca dell'eventuale danno d'organo a fini diagnostici e di follow-up, tramite indagini cliniche e strumentali (Salviati et al., 2010).

La frequenza e la gravità del dolore dovrebbe essere studiato ripetutamente tramite scale come la Brief pain inventory o la McGill Pain inventory.

Esami laboratoristici per valutare i fattori di rischio cerebrovascolare possono identificare pazienti con livelli significativamente elevati di omocisteina, con uno stato carenziale vitaminico, o con altri fattori protrombotici.

### **2.3.5 Disturbi uditivi e vestibolari**

Disturbi uditivi e vestibolari sono frequentemente riscontrati in pazienti con la malattia di Fabry, con una sintomatologia caratterizzata da perdita dell'udito, tinnito e vertigine.

Vi sono evidenze di una elevata incidenza sia della progressiva perdita dell'udito che della improvvisa sordità nei maschi affetti dalla forma classica (Germain, 2010).

E' stata dimostrata la correlazione fra il danno neuropatico e vascolare con la perdita uditiva: nei maschi affetti il grado di attività enzimatica residua era un fattore protettivo contro la perdita dell'udito neurosensoriale.

### **2.3.6 Manifestazioni oculari**

Opacità corneali visibili con l'esame con la lampada a fessura sono i più comuni e precoci fra i segni oculari, essendo presenti in tutti i maschi emizigoti.

Deve tuttavia essere notato che la terapia con amiodarone o con cloroquina produce segni oculari simili.

E' inoltre frequentemente presente una tortuosità dei vasi congiuntivali retinici da moderata a marcata.

Né la distrofia corneale, né le lesioni retiniche e congiuntivali vanno a compromettere la acuità visiva; tuttavia, una perdita acuta della vista può essere causata da una occlusione unilaterale della arteria centrale retinica.

La cataratta subcapsulare anteriore e posteriore è inoltre descritta, detta "cataratta di Fabry", segno oculare patognomnico della patologia.

È descritto inoltre un ingrandimento della macchia cieca è stato descritto nel 38,7% dei pazienti, nonostante questo non sia associato con difetti della visione (Sodi et al., 2007; Germain, 2010).

### **2.3.7 Disturbi respiratori**

Il coinvolgimento respiratorio si manifesta con dispnea nell'esercizio fisico, tosse cronica ed è frequente in pazienti Fabry di entrambi i sessi.

Uno studio recente ha rivelato una prevalenza di disturbo ostruttivo delle vie respiratorie del 26% nelle donne e del 61% negli uomini.

Un coinvolgimento polmonare progressivamente ingravescente, età e sesso dipendente, è dunque frequente, e l'effetto della terapia sostitutiva sul coinvolgimento polmonare è tuttora in corso di accertamento.

Recentemente è stato osservato che la ERT può stabilizzare il disordine ostruttivo (Mangage et al., 2005).

### **2.3.8 Coinvolgimento scheletrico**

In un recente studio è stata esaminata tramite DEXA (Dual Energy X-ray Adsorptiometry) la densità ossea del tratto lombare e della testa del femore in 23 maschi affetti con età media di 31 anni. Utilizzando la classificazione WHO, 20 su 23 avevano osteopenia o osteoporosi (rispettivamente 11 e 9) ad uno o ad entrambi i siti studiati.

Il coinvolgimento scheletrico è stato inoltre confermato in una più ampia coorte di pazienti ove il 50% di 53 pazienti sono risultati osteopenici.

Sono stati descritti casi di fratture lombari spontanee in severa osteoporosi (Germain, 2010).



Per questo motivo sono raccomandati controlli mineralometrici nei pazienti affetti e vi è indicazione al trattamento con vitamina D3, in caso fosse deficitaria.

### **2.3.9 Depressione e qualità di vita**

La deflessione del tono dell'umore è un problema frequente, anche se sottodiagnosticato e sotto riportato.

Il 46% e 28% dei pazienti hanno, rispettivamente, depressione e depressione grave (Gold et al., 2002)

La maggior parte dei pazienti identificati in una recente ricerca erano sotto diagnosticati per depressione, che sottolinea la necessità di un corretto metodo per identificare i pazienti Fabry con sintomi depressivi.

I benefici della ERT sono peraltro sconosciuti, dato che non è stato preso in considerazione tale fatto.

La depressione può impattare seriamente la qualità di vita nei pazienti con malattia di Fabry. Sono stati utilizzati differenti questionari mirati a misurare la qualità di vita, come il SF-36, EuroQOL e il MMPI-2.

In tutti i pazienti affetti da tale patologia sono raccomandate valutazioni neuropsicologiche e della qualità di vita (Segal et al., 2010).

### **2.3.10 Miscellanea**

Anemia: dati del FOS e del Fabry Registry mostrano che i pazienti Fabry hanno frequentemente una moderata citopenia periferica, in modo preminente una anemia.

E' stato segnalato un rimodellamento della parete arteriosa e ispessimento medio-intimale, seppur in assenza di placche aterosclerotiche.

Sono presenti dimorfismi faciali, più evidenti nei maschi e correlati con il livello di carenza enzimatica.

In un piccolo studio sono stati evidenziati casi di ipotiroidismo subclinico. Sarebbe utile eseguire un assessment laboratoristico endocrinologico nei pazienti affetti.

In uno studio su pazienti Fabry è stata notata la presenza di cisti renali parapelviche, la presenza delle quali si pensa possa indicare la presenza della malattia di Fabry stessa (Germain, 2010).

### **2.3.11 Soggetti di sesso femminile**

Tradizionalmente si considera che i soggetti eterozigoti non sviluppino sintomi e che le donne siano in questi casi i "carrier" ovvero portatrici sane del gene implicato.

Un crescente numero di pubblicazioni e lo sviluppo delle conoscenze circa il corso naturale della patologia indicano che il termine X-linked recessivo debba essere abbandonato e che la malattia di Fabry debba essere descritta come “ereditarietà X-linked”.

Segni e sintomi clinici variano ampiamente nelle donne affette. Questa eterogeneità fenotipica è da imputare al fenomeno di Lyonizzazione (Lyon, 1961), in cui una delle copie del cromosoma X viene inattivato, in tutte le cellule dell’embrione destinato a sviluppare un soggetto di sesso femminile.

Cosicché tali soggetti sono essenzialmente un mosaico di cellule normali e con mutazione in proporzioni variabili.

Se la proporzione delle cellule portatrici della mutazione è preponderante rispetto alle cellule normali, il soggetto presenterà sintomi con maggiore probabilità.

Lo spettro clinico nelle donne può andare dalla completa asintomaticità, fino ad osservare il fenotipo della cosiddetta forma classica, con un’ampia variabilità di manifestazioni nelle forme intermedie.

Una elevata percentuale di donne sviluppa danno d’organo che coinvolge in maggior misura il cuore, e meno, il rene, circa un decennio più tardi rispetto ai maschi affetti.

Delle 1077 donne arruolate nel Fabry Registry, 69,4% aveva segni e sintomi della malattia di Fabry.

L’età media all’esordio della sintomatologia fra le donne era 13 anni, e il 20% aveva eventi cardiaci, cerebrovascolari e renali maggiori ad un’età media di 46 anni.

Ne deriva che anche le donne affette debbano essere regolarmente monitorate, per evidenziare l’insorgenza di sintomi e segni di coinvolgimento multi organo, qualora dovessero comparire, il più precocemente possibile.

### **2.3.12 Varianti atipiche**

La malattia di Fabry è stata a lungo considerata come un disturbo multi sistemico con ampio coinvolgimento di differenti organi e sistemi, aspettando che la maggior parte, se non la totalità dei maschi affetti, dovesse presentare un fenotipo “classico”.

Successive sottoclassificazioni hanno evidenziato che pazienti con sintomi predominanti cardiaci o renali possono andare costituire una variante cardiaca o renale rispettivamente.

Nelle popolazioni adulte ad alto rischio sono state infatti intraprese campagne di screening per specifiche patologie, come malattia renale end-stage, ipertrofia cardiaca o ictus, con buoni risultati diagnostici, fra cui anche un nostro studio di screening, attualmente il lavoro è stato sottoposto ai referee di BMCN (Rolfs et al., 2005; Brouns et al., 2007 e 2010; Wozniak et al.,

2010; Baptista et al., 2010; Sarikaya et al., 2012; Marquardt et al., 2012; Fancellu et al., under revision).

Le varianti di malattia di Fabry hanno pochi segni e sintomi distintivi della patologia, avendo le manifestazioni confinate in un organo o sistema. Esse si presentano inoltre più tardivamente, attorno alla quarta o quinta decade e sono spesso diagnosticate casualmente. Al contrario dei soggetti affetti dalla forma classica, qui vi è un'attività enzimatica residua che varia dal 2% al 20% del normale.

La variante cardiaca è quella maggiormente descritta e include manifestazioni quali cardiomegalia, alterazioni elettrocardiografiche, cardiomiopatia, cardiomiopatia ipertrofica non ostruttiva e infarto del miocardio; può talvolta essere rilevata una lieve proteinuria.

La variante renale è stata identificata fra pazienti dializzati o con danno renale end-stage in Giappone (Nakao et al., 2003).

I pazienti avevano un'attività enzimatica praticamente nulla. Un controllo precoce nei pazienti con malattia renale è dunque essenziale.

Si intendono col termine di varianti intermedie i casi di pazienti in cui, in assenza di segni e sintomi infantili e adolescenziali, attorno ai 40 anni si sviluppa un quadro di cardiomiopatia ipertrofica con successiva comparsa di danno renale end-stage (Germain et al., 2001).

## **2.4 Eziopatogenesi**

La malattia di Fabry è una patologia trasmessa come un disordine X linked. Il gene responsabile è collocato nel braccio lungo del cromosoma X nella posizione Xq22.

Il gene, denominato GLA, consiste di 7 esoni, con 12,436 paia di basi. Vi è una grande eterogeneità allelica, ma non eterogeneità nel locus.

La malattia di Fabry può essere causata da una grande varietà di mutazioni puntiformi missenso e nonsense, di splicing, piccole delezioni o inserzioni o ampie delezioni.

Sono state trovate più di 585 mutazioni (The Human Gene Mutation Database at the Institute of Medical Genetics in Cardiff. [<http://www.hgmd.cf.ac.uk>]).

La maggior parte di queste codifica per un enzima non funzionante. La maggior parte delle famiglie ha un'unica mutazione che può spiegare le manifestazioni interfamiliari, sebbene ci sia una marcata variabilità interindividuale familiare stessa.

Ci sono controversie per alcune mutazioni, e polimorfismi, in particolare, un acceso dibattito è sorto attorno alla p.Asp313Tyr nell'esone 6 (Froissart et al., 2003). Per queste sequenze, un altro esempio è la Arg112His, è ancora aperta la discussione per stabilire se siano vere mutazioni o polimorfismi.

La struttura tridimensionale dell'enzima alfa-galattosidasi A umana è stata studiata attraverso la cristallografia a raggi X. È una molecola omodimerica in cui ogni monomero è composto da due domini.

Il dominio N-terminale è il classico (b/a)<sub>8</sub> barrel (ovvero un ampio foglietto beta con particolare conformazione) mentre il C-terminale contiene otto b antiparallele ripiegate in un b sandwich.

I residui 32-328 comprendono il dominio N-terminale, e i residui 329-421 quello C-terminale. Il dominio N-terminale contiene il sito attivo, che è collocato alla fine del dominio C-terminale, vicino al centro del b barrel. Ci sono tre carboidrati N-linked sulla superficie della molecola, lontano dal sito attivo. L'enzima si arrotola in una configurazione tridimensionale che ingloba 15 residui in un sito attivo.

I due siti attivi del dimero sono separati da approssimativamente 50 Å (Armstrong (Guce et al., 2010 a e b)).

L'enzima usa un meccanismo con reazione a doppio spostamento, dove due successivi agganci al carbonio anomero del substrato, portano a rompere il legame glicosidico, trattenendo l'anomero del substrato stesso.

## 2.5 Diagnosi

Un esordio precoce dei segni e sintomi della malattia di Fabry esige una diagnosi pronta, soprattutto perché vi è la disponibilità della terapia. Tuttavia il riconoscimento della malattia di Fabry può essere difficile per diversi motivi: le manifestazioni della malattia sono spesso eterogenee, i sintomi possono somigliare a malattie più comuni e i danni renali o cardiaci più gravi sono inusuali nei bambini.

Un ritardo diagnostico è ancora possibile e i pazienti spesso vengono visitati da più specialisti prima che una corretta diagnosi sia posta. Generalmente il ritardo diagnostico si attesta attorno ai 15 anni.

La dimostrazione di una scarsa o assente attività enzimatica nel plasma o nei leucociti è la metodica di riferimento che deve sistematicamente essere utilizzata per confermare il sospetto clinico, che sarà conclusiva nei maschi. La determinazione plasmatica può dar luogo occasionalmente a falsi positivi e deve essere confermato dall'analisi leucocitaria.

Invece le donne affette possono avere un'attività enzimatica normale, quindi tutte le donne devono effettuare il test genetico.

Vi è inoltre un test fluorimetrico che utilizza filtri di carta (dried blood spot), che permette la conservazione dei campioni fino a 6 mesi grazie alla stabilità dell'enzima.

Il dosaggio del globotriaosilceramide plasmatico è stato proposto come metodica diagnostica, ma richiede molto tempo e non è molto affidabile.

Un marker più affidabile, sia nel maschio che nella femmina, è il Gb3 urinario, tuttavia il Gb3 in alcune mutazioni e nelle forme ad esordio tardivo può essere basso.

La genotipizzazione è, come già accennato, mandatoria nelle donne e nei maschi con bassi livelli enzimatici, o nei casi comunque dubbi. L'analisi molecolare diretta è semplice, data la piccola taglia del gene e permette una precisa caratterizzazione della mutazione.

Un metodo che utilizza dried blood spot è stato sviluppato anche per il sequenziamento del gene.

La Denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC) è stata dimostrata essere una tecnica vantaggiosa negli screening.

Poiché un sequenziamento diretto sugli esoni può mancare il riconoscimento di delezioni, l'uso di Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) è raccomandato nei casi in cui ci sia una bassa attività enzimatica, non associata all'identificazione di alcuna mutazione (Germain, 2010).

### **2.5.1 Screening**

Lo screening di individui con storia familiare di malattia di Fabry o gli screening nei neonati sono gli unici modi per diagnosticare la malattia prima dell'esordio della sintomatologia.

Inoltre, gli screening di pazienti in gruppi di persone ad alto rischio, che possono mostrare sintomi e segni tardivi della malattia possono essere un metodo per ottimizzare le diagnosi e il management della malattia in questi pazienti.

Ogni screening richiede un metodo ampiamente disponibile sul mercato, preferibilmente a un costo contenuto e che renda possibile tempi rapidi.

Generalmente viene utilizzata la misurazione della attività dell'alfa galattosidasi. Tuttavia questa metodica può dare dei falsi negativi. L'identificazione dell'enzima con dried blood spots (DBS) può essere più affidabile come metodica di screening nei maschi ma può dare anche essa falsi negativi in un terzo delle donne affette (Germain, 2010).

### **2.5.2 Istologia**

Con la microscopia tradizionale l'osservazione di materiale biptico non è sempre di aiuto nella diagnosi, ma l'accumulo di lipidi nelle biopsie renali può evidenziare l'accumulo lipidico, soprattutto con la preparazione a fette semi-sottili colorate con toluidina blu o la colorazione tricromia di Masson, permettendo la diagnosi.

Tuttavia tale procedura, per la quantità di falsi negativi e la specificità del risultato non dovrebbe essere utilizzata a fini diagnostici.

Microscopia elettronica è altamente specifica e mostra sia a livello endomiocardico che renale le inclusioni lipidiche a strati dette “Zebra bodies” o figure mieliniche. Anche in questo caso è comunque da preferire l’analisi enzimatica, a meno che non sussistano dubbi in caso per esempio di maschi con attività enzimatica residua.

La biopsia cutanea con studio al microscopio elettronico può essere un test diagnostico addizionale quando attentamente interpretato da un patologo esperto. Inoltre la biopsia cutanea è spesso normale nelle donne eterozigoti e quindi di scarsa utilità.

### **2.5.3 Altri markers**

Sebbene i test di laboratorio siano usualmente normali, sono stati frequentemente riportati l’anemia, l’iperomocisteinemia, un aumentato colesterolo HDL.

Una delle più urgenti necessità è quella di trovare biomarker validi con cui determinare la progressione di malattia e la risposta al trattamento, idealmente un test non invasivo. Attualmente non vi è un biomarker plasmatico o urinario specifico per la malattia di Fabry.

La Globotriaosilsfingosina o il lyso-Gb3 sono stati visti come elevati, nei maschi affetti e meno nelle donne affette.

E’ stato proposto come biomarker nel monitoraggio della risposta alla terapia (Van Breemen et al., 2010). Si è visto infatti come i livelli diminuiscano dopo l’inizio della ERT.

Elevati livelli di lyso-Gb3 sono stati dimostrati essere un fattore di rischio indipendente per lo sviluppo di lesioni della sostanza bianca cerebrale nei pazienti maschi, mentre correla con la gravità di malattia nelle donne (Rombach et al., 2010).

Anche il lyso-Gb3 urinario è stato proposto come biomarker, specialmente in pazienti nefropatici.

La Sfingosina-1-fosfato (S1P) è stata recentemente identificata come fattore promuovente il rimodellamento cardiaco e vascolare endoteliale (IMT) (Brakch et al., 2010).

### **2.6 Diagnosi differenziale**

Nell’infanzia, altre possibili cause di dolore come l’artrite reumatoide, la febbre reumatica, il LES, la malattia di Raynaud e i dolori di crescita devono essere esclusi.

Nell’adulto la malattia celiaca e la sclerosi multipla sono le malattie principalmente poste in diagnosi differenziale.

Inoltre c’è da considerare che una combinazione di polimorfismi in un singolo nucleotide (SNPs) del gene GLA può portare ad una riduzione del enzima alfa galattosidasi, sebbene

rimanga nel range di normalità, e possono costituire un fattore di rischio per lo sviluppo di cardiomiopatia ipertrofica e ictus ischemico.

## **2.7 Terapia**

Dal 2001 è disponibile per questa malattia lisosomiale una terapia enzimatica sostitutiva specifica.

Da allora, è stata monitorata per studiarne l'efficacia e la sicurezza, ma molti aspetti, soprattutto riguardanti l'efficacia devono essere ancora monitorati negli studi a lungo termine. Per esempio le attuali linee guida per l'inizio della terapia variano da un paese all'altro, rimanendo peraltro non conclusive per quanto riguarda i bambini e le donne.

In Europa vi sono al momento due preparazioni dell'enzima: la agalsidasi alfa (Replagal, Shire, Cambridge, MA, USA), che viene prodotto usando colture di fibroblasti umani e registrata per un uso alla dose di 0,2 mg/Kg ogni 15 giorni, e la agalsidasi beta (Fabrazyme, Genzyme, Corp, Cambridge, MA, USA), prodotto dall'espressione del cDNA dell'alfa galattosidasi umana in cellule dell'ovaio di Cavia Cinese (CHO) e registrato per un uso a 1,0 mg/Kg ogni 15 giorni.

La sicurezza ed efficacia di entrambi questi enzimi è stata testata in trial randomizzati, in doppio cieco, controllati da placebo e con estensione degli studi per entrambi i farmaci in gran parte a carico delle industrie farmaceutiche, anche con la creazione di registri (Germain, 2010).

### **2.7.1 Agalsidasi alfa**

Questo farmaco, (Replagal-agalsidase alfa, European Public Assessment Report EPAR [<http://www.emea.europa.eu/humandocs/Humans/EPAR/replagal/replagal.htm>]) approvato in 45 paesi per il trattamento della malattia di Fabry, è stato in particolar modo studiato tramite il registro Fabry Outcome Survey.

Da dati provenienti da questo registro sembra che vi sia un miglioramento dei sintomi clinici precoci, con riduzione del dolore neuropatico e della qualità di vita, a partire già dall'età infantile e adolescenziale.

Nell'estensione a 3,5 anni degli studi di efficacia e sicurezza di tale farmaco si è evidenziata una riduzione dei valori plasmatici di Gb3 e delle acroparestesie, test effettuati tramite il questionario Brief Pain Inventory.

Parallelamente è emerso un significativo miglioramento della qualità di vita dopo almeno 24 mesi di ERT. I livelli medi di Gb3 urinario erano ridotti alla normalità. La funzione renale e lo spessore del ventricolo sinistro indicizzato al peso sono rimasti stabili.

Anche la sintomatologia gastrointestinale sembra si possa giovare della terapia sostitutiva. La funzione renale si è mantenuta stabile dopo 1-2 anni di ERT in molteplici studi (misurata tramite GFR e clearance della creatinina). Nei maschi affetti, con nefropatia allo stadio 1 e 2, tuttavia, la GFR ha continuato a ridursi sebbene la proteinuria fosse inferiore al grammo (Feriozzi et al., 2008). Nei pazienti in cui la funzione renale era già compromessa e ha continuato a peggiorare anche con la terapia con agalsidasi alfa, è stato somministrato il farmaco ogni settimana, e in qualche caso vi è stato un miglioramento. In una recente metanalisi sembra che la ERT con agalsidasi alfa possa rallentare il declino della funzione renale nei pazienti con nefropatia da lieve a moderata e una proteinuria sotto il grammo/die. Tuttavia non è in grado di migliorare la proteinuria (West et al., 2009). Un miglioramento della funzione cardiaca e in particolare una riduzione nella massa del ventricolo sinistro è stata osservata in donne in ERT da almeno 27 settimane. Una riduzione nel volume ventricolare medio e del setto è stato evidenziato nei pazienti appartenenti al FOS dopo 1 e 2 anni di trattamento, evidenziando la maggior riduzione nei pazienti con spessore maggiore all'esordio. Per quanto concerne l'effetto del farmaco sul sistema nervoso centrale, sembra che non ci sia una efficacia: vi è nonostante la ERT una progressione delle lesioni della sostanza bianca in 2 pazienti su 7. In realtà questo studio aveva coinvolto un piccolo numero di pazienti con follow-up limitato ad un anno, e a tutt'oggi, non è noto se la terapia possa prevenire complicazioni cerebrovascolari o la perdita di udito associata alla malattia di Fabry. La gravità dello stato clinico può essere monitorata tramite in Mainz Severity Score Index (MSSI) che consta di una parte generale, una nefrologica, cardiologica e neurologica. Le cause di morte principali nei malati affetti da malattia di Fabry, estrapolate dal FOS, sono L'insufficienza renale negli uomini e i disordini cerebrovascolari nelle donne. I disordini cardiovascolari sono la causa di morte più frequente per entrambi i sessi (Germain, 2010).

### **2.7.2 Agalsidasi beta**

Questo farmaco è stato approvato in 55 paesi, compresi gli USA.

Fabrazyme (agalsidase beta) European Public Assessment Report (EPAR). [<http://www.emea.europa.eu/humandocs/Humans/EPAR/fabrazyme/fabrazyme.htm>.]

E' stata osservata una completa clearance del Gb3 da cellule renali, urina e cardiomiociti dopo almeno 20 settimane di terapia con agalsidasi beta.

Tali risultati sono stati sostenuti da una durata di trattamento di 4,5 anni, in un altro studio, con una evidenza di miglioramento contenuto nella clearance del Gb3 dalle cellule epiteliali



renali (podociti, cellule tubulari epiteliali distali). Non è mai stato possibile evidenziare una clearance completa dai podociti.

Nel cuore, 5 mesi di trattamento in uno studio di fase tre hanno mostrato una completa eliminazione del Gb3 dalla microcircolazione cardiaca nel 72% dei pazienti trattati, comparato con il solo 3% dei pazienti trattati con placebo. Il gruppo placebo ha ottenuto gli stessi risultati dopo 6 mesi di trattamento nella estensione di studio open label.

È stata inoltre dimostrata una stabilizzazione e in alcuni casi una riduzione dello spessore del ventricolo sinistro dopo 12 mesi di terapia. In alcuni studi pediatrici è stato dimostrato, anche con biopsie cutanee l'eliminazione del Gb3 dai depositi endocellulari (presenti prima del trattamento) dopo 12 settimane di terapia con agalsidasi beta.

Il trattamento era generalmente ben tollerato, e la maggior parte degli eventi avversi erano lievi o moderati.

L'efficacia sui sintomi precoci, fra cui il dolore è stata riportata in vari studi, inclusa l'estensione della fase tre. Il dolore è stato per lo più misurato tramite la McGill Pain Questionnaire, ed è migliorato con il tempo.

Uno studio ha valutato la funzione delle fibre nervose in 22 maschi con neuropatia di Fabry e ha riportato miglioramenti specialmente per le piccole fibre.

La qualità di vita, misurata nei pazienti del Fabry Registry tramite la SF-36, è globalmente migliorata.

La funzione renale nei pazienti adulti viene solo in parte migliorata, con una terapia continuativa con il farmaco: nella maggior parte dei pazienti a 4,5 anni di terapia la proteinuria, il GFR, e la creatinina sierica rimangono stabili e normali.

I pazienti che peggioravano avevano più di 40 anni e valori di base di proteinuria  $>2$  g/24ore ovvero danno renale da moderato a grave.

Non è noto se questo farmaco possa ridurre o stabilizzare il danno cerebrovascolare.

### **2.7.3 Comparazione fra i due farmaci**

L'efficacia e la tollerabilità tra i due composti sono state comparate in un trial open-label.

Lo studio non ha rilevato differenze significative fra i due farmaci quanto a riduzione della massa del ventricolo sinistro o altri parametri della malattia a 12 e 24 mesi di trattamento.

Fallimenti terapeutici sono stati descritti in entrambi i gruppi e sono sembrati correlati all'età e a malattie correlate a pretrattamenti, come descritto negli studi derivanti dai due principali registri (Fabry registry e Fabry Outcome Survey).

In un altro studio comparativo sono stati ricercati autoanticorpi anti alfa-galattosidasi: sono stati trovati specialmente nei maschi e interferivano con l'escrezione di Gb3 urinario. Erano presenti in entrambi i trattamenti.

Molte problematiche sono insorte due anni fa per un deficit produttivo dell'agalsidasi beta che ha portato dapprima ad uno shortage del farmaco nei pazienti che lo praticavano e successivamente, per molti di essi allo shift verso l'agalsidasi alfa.

Attualmente la produzione è ripresa.

#### **2.8.4 Terapie sintomatiche**

La ERT da sola non può controllare tutti i sintomi, per cui è necessario che i pazienti vengano trattati con i farmaci che convenzionalmente vengono prescritti per le problematiche che insorgono nella patologia (antiipertensivi, antidolorifici, supplementi vitaminici etc).

Di questi farmaci non verrà effettuata una trattazione in questa sede.

#### **2.8.5 Nuove terapie**

Negli ultimi anni molta attenzione è stata rivolta alla terapia con gli chaperone. Il loro ruolo è legato al mantenimento della struttura delle proteine assicurando il raggiungimento e il mantenimento del corretto stato conformazionale delle catene polipeptidiche dell'enzima. Naturalmente ciò è possibile laddove vi sia una attività enzimatica possibile (Yam et al., 2005). Glaxo Smith Kline e Amicus Therapeutics hanno collaborato per l'elaborazione e lo sviluppo del migalastat HCl (Amigal) un chaperone che dovrebbe essere in grado di stimolare l'attività enzimatica residua nei pazienti affetti da malattia di Fabry (Germain, 2010).

### **3. Studio elettrofisiologico: Fabry e stimolazione magnetica transcranica**

Nella malattia di Fabry risultano coinvolti sia il sistema nervoso periferico che sistema nervoso centrale. Sono infatti stati descritti eventi ischemici maggiori, eventi ischemici transitori, neuropatia periferica dolorosa e disfunzioni autonome. (Ginsberg, 2006).

La patogenesi del danno del sistema nervoso è stata chiarita solo parzialmente. Si pensa che la patologia cerebrovascolare sia correlata con una alterazione del controllo dei vasi secondaria a disfunzione endoteliale, con conseguente sviluppo di patologia trombotica o embolica a partenza sia cardiaca che artero-arteriosa. Oltre allo stato protrombotico è stata descritta una iperperfusionazione cerebrale principalmente a carico del circolo posteriore (Bersano et al., 2012).

Sia il danno vascolare che l'accumulo neuronale di glicosfingolipidi sono considerati potenziali meccanismi per la neuropatia dolorosa e la disautonomia (Zarate e Hopkin, 2008; Biegstraten, 2012).

Considerando che i lisosomi sono organelli subcellulari ubiquitari (De Duve, 1975) è ipotizzabile che l'accumulo intracellulare di glicosfingolipidi osservato nelle malattie lisosomiali possa indurre cambiamenti patologici non solo nei neuroni delle vie sensitive ma anche in altre cellule nervose come i motoneuroni.

Questa ipotesi è stata confermata sia da uno studio autoptico su un paziente affetto da malattia di Fabry che ha mostrato alterazioni di tipo assonale del tratto piramidale (Okida e Nishiara 2008), sia da studi di neuroimaging con spettroscopia RM, (Tedeschi et al., 1999; Marino et al., 2006), che hanno mostrato un diffuso coinvolgimento neuronale nella malattia di Fabry, con interessamento cerebrovascolare in diverse aree.

Questi dati inoltre sono in accordo con quelli ottenuti su modelli animali di ischemia cerebrale che documentano come una ischemia cerebrale incompleta causa alterazioni neuronali in primis nelle aree corticali, anche senza danno pancellulare manifesto con necrosi e infarto (Sieber et al., 1995).

Altri studi neurofisiologici effettuati nell'uomo hanno dimostrato cambiamenti nelle eccitabilità delle aree cerebrali lontane da quelle colpite da danno ischemico (Shimizu et al., 2002, Butterfish et al., 2003, Swaine et al., 2008).

Interessante è inoltre il fatto che un'abnorme eccitabilità nella corteccia motoria sia stata documentata in altre due malattie da accumulo lisosomiale: la sialidosi tipo 1 (Huang et al., 2008) e la malattia di Gaucher (Perretti et al., 2005).

Sulla base di queste evidenze abbiamo ipotizzato che potessero configurarsi alterazioni nella eccitabilità della corteccia motoria nei pazienti con malattia di Fabry, sia sintomatici che

asintomatici. Per verificare questa ipotesi, abbiamo condotto uno studio di stimolazione magnetica transcranica testando diversi parametri utili a misurare l'integrità delle proiezioni corticospinali e la funzionalità dei circuiti inibitori ed eccitatori intracorticali (Chen et al., 2008) con lo scopo di evidenziare eventuali disfunzioni neurologiche subcliniche nei pazienti con malattia di Fabry.

### **3.1 Metodi**

#### **3.1.1 Campione**

Lo studio è stato condotto su 11 pazienti affetti da malattia di Fabry geneticamente determinata (7 donne e 4 uomini, età media:  $38.9 \pm 16.8$  anni, range 23-64 anni; altezza media  $162.4 \pm 8.6$ cm; range 154-180 cm) (tabella 1).

Tutti i pazienti sono stati sottoposti preliminarmente a risonanza magnetica dell'encefalo e ad uno studio elettroencefalografico ai 4 arti. Sono stati valutati sia al tempo zero (T0) che dopo un anno (T1) di terapia enzimatica sostitutiva (ERT).

Inoltre sono stati coinvolti 11 controlli sani appaiati per età, sesso e altezza (7 donne e 4 uomini, età media:  $37.4 \pm 17.2$  anni, range 21-65 anni, altezza media 158-181 cm  $163 \pm 7.3$  cm) al tempo zero. Tutti i partecipanti hanno dato il proprio consenso informato alla procedura, approvato dal Comitato Etico locale, redatto in accordo con gli standard etici stabiliti dalla dichiarazione di Helsinki.

## Tabella 1

Caratteristiche cliniche dei pazienti (Ortu et al., 2013)

Patients	Sex	Age	$\alpha$ -Gal A activity <sup>a</sup> (nmol/ml/h)	GLA gene mutations	Brain MRI	Standard NCV examination <sup>b</sup>	Clinical details
A	M	41	0.1	p.Arg227Gln	Diffuse lacunar infarctions and leukoaraiosis. Right cerebellar infarction	Normal	Neuropathic pain hypertensive heart disease, TIA and Stroke
B	M	23	2.5	p.Arg227Gln	Normal	Normal	Neuropathic pain
C	M	30	2.5	p.Arg227Gln	Normal	Normal	Neuropathic pain
D	F	51	8.1	p.Arg227Gln	Normal	Normal	Neuropathic pain
E	F	18	6.6	p.Arg227Gln	Normal	Normal	Neuropathic pain
F	F	52	15.4	p.Asp313Tyr	Diffuse lacunar infarctions and leukoaraiosis	Normal	Hypertensive heart disease
G	M	29	2.0	p.Asp313Tyr	Normal	Normal	Normal
H	F	65	11.1	p.Gln57Arg	Normal	Normal	Neuropathic pain
I	F	64	14.1	p.Gln57Arg	Normal	Normal	Normal
L	F	24	11.5	p.Gln57Arg	Normal	Normal	Normal
M	F	40	9.7	IVS3 + 1G > A	Normal	Normal	Neuropathic pain, TIA

<sup>a</sup> Normal plasmatic  $\alpha$ -Gal A activity: >2.0 nmol/ml/h.

<sup>b</sup> Nerve conduction velocity (NCV) examination was performed on upper arms; motor and sensory components of median and ulnar nerves were evaluated.

### 3.1.2 Registrazioni EMG

I potenziali evocati motori (MEPs) sono stati registrati dal muscolo primo interosseo dorsale (FDI) destro usando elettrodi a coppetta del diametro di 9 mm con superficie rivestita di Ag/Ag-Cl.

L'elettrodo attivo era posto sul ventre muscolare, l'elettrodo di riferimento sull' articolazione metacarpo falangea del dito indice e la terra era fissata sull'avambraccio.

I partecipanti allo studio erano seduti comodamente, con la testa e il collo poggiati su un supporto. L'attività EMG è stata registrata mantenendo il muscolo FDI completamente rilassato.

I segnali EMG sono stati amplificati, filtrati e campionati (5KHz per canale) da 100 millisecondi prima a 400 millisecondi dopo lo stimolo, usando il convertitore A/D 1401 plus (Cambridge electronic design, Cambridge, UK) e il software Signal 3.06 sul computer.

I trial contaminati dalle attività EMG sono stati scartati dall'analisi.

### 3.1.3 Stimolazione magnetica transcranica

La stimolazione magnetica transcranica è stata effettuata utilizzando una sonda ad otto con diametro esterno di 9 cm connessa con uno stimolatore a doppio stimolo (Bistim module, Magstim Co., Whitman, Dyfed, UK). La sonda veniva poggiata sullo scalpo del soggetto in esame, in corrispondenza della rappresentazione corticale dell'area motoria della mano destra e orientata approssimativamente sulla perpendicolare del solco centrale, a circa 30 gradi dalla linea mediana.

E' stato cercato il punto ottimale per evocare un potenziale evocato motorio (MEP) nel muscolo FDI, e la posizione ottimale della sonda capace di evocare un MEP stabile è stata marcata con un segno sullo scalpo per non perdere la localizzazione corretta durante l'esperimento.

L'intensità di stimolo è stata calcolata come percentuale del massimo output di stimolo (%MSO). In accordo con le linee guida IFNC (Rossini et al., 1994; Rothwell et al., 1999), la soglia motoria a riposo (RMT) è stata definita come la minima intensità di stimolo capace di indurre un MEP di circa 50 microvolt da picco a picco in almeno 5 su 10 trial consecutivi nel muscolo rilassato, mentre la soglia motoria attiva (AMT) è stata definita come la minima intensità di stimolo capace di evocare un MEP di circa 200 microvolt da picco a picco in almeno 5 su 10 trial consecutivi durante la contrazione isometrica del muscolo testato al 10% della contrazione massimale volontaria (MVC).

### **3.1.4 Procedure sperimentali**

Nell'esperimento principale sono stati esaminati tutti i seguenti parametri: il tempo di conduzione motoria centrale (CMCT), la curva input output (IN-OUT), l'inibizione intracorticale a breve latenza (SICI), la facilitazione intracorticale (ICF), l'inibizione intracorticale a lunga latenza (LICI), la facilitazione intracorticale a breve latenza (SICF), il periodo silente corticale (cSP), e l'inibizione afferente a breve latenza (SAI).

Il CMCT è stato calcolato sottraendo la latenza del MEP medio ottenuto da stimolazione magnetica delle radici spinali a livello di C7 dal MEP medio ottenuto dalla stimolazione corticale. (Mills e Murray, 1986).

La curva IN OUT è stata costruita rappresentando in un sistema di assi cartesiani l'ampiezza media dei MEP ottenuti con cinque differenti intensità di stimolo, da 110% a 150% della RMT.

La SICI e la ICF sono state studiate tramite il classico protocollo costituito da uno stimolo condizionante sottosoglia (S1) seguito da uno stimolo test soprasoglia (S2) (Kujirai, 1993; Fisher et al., 2002).

La LICI è stata valutata utilizzando il protocollo a doppio stimolo con entrambi gli stimoli (S1 e S2) soprasoglia con intensità capace di elicitare un MEP di 1 mV nel FDI destro. Sono stati somministrati ad intervalli di stimolo (ISIs) di 50, 100, 150, e 200 mS. (Valls-Solè et al., 1992;

Wasserman et al., 1996). Sono stati somministrati cinquanta stimoli randomizzati (10 impulsi per ciascuno dei 4 ISIs e 10 impulsi per il solo test MEP).

La SICF è stata studiata tramite il protocollo a doppio stimolo (S1 soprasoglia ed S2 sottosoglia) descritto da Zeman et al. (1998).

Il cSP è stato valutato tramite protocollo a singolo stimolo mentre il soggetto eseguiva una contrazione volontaria pari a circa il 30% della MCV. Sono state testate due intensità di stimolo, il 120% e il 150% della RMT rispettivamente. La durata del periodo silente, espressa in millisecondi è stata misurata off line come suggerito da Cantello et al. (1992).

SAI è stata studiata attraverso il protocollo proposto da Tokimura et al. (2000). Lo stimolo condizionante (S1) era costituito da uno stimolo elettrico di 200 ms di durata applicato tramite elettrodo bipolare al nervo mediano al polso usando uno stimolatore Digimeter DS7A (Digimeter, Welwyn Garden City, Hertz, UK). L'intensità di S1 è stata settata appena al di sopra della soglia motoria per evocare una contrazione visibile del muscolo tenar.

I 9 pazienti che hanno partecipato allo studio al tempo T1 sono stati divisi in due gruppi: il gruppo A includeva cinque pazienti (pazienti B, C, E, F e M), trattati per un anno con la terapia enzimatica sostitutiva con agalsidasi Alfa (Replagal Shire human genetic therapy) 0,2 mg/kg somministrati endovena ogni 15 giorni.

Il gruppo B comprendeva i pazienti non trattati. Sulla base dei risultati ottenuti nell'esperimento principale al tempo T0, in entrambi i gruppi sono state esaminate la RMT, AMT, curva IN-OUT, SICI/ICF e SICF.

### **3.1.5 Analisi dei dati**

L'analisi statistica è stata effettuata utilizzando il software SPSS 13 (SPSS INC, Chicago, Illinois USA)

Nell'esperimento principale, i valori di RMT, AMT, CMCT e CSP, ottenuti sia nei pazienti che sui controlli sono stati confrontati usando il test t di Student. La curva IN-OUT, la SICI/ICF, LICI SICF, e SAI sono stati confrontate tramite analisi della varianza RM ANOVA.

Nell'esperimento pilota I valori di RMT e AMT al T0 e T1 sono stati comparati utilizzando il t di Student per dati appaiati mentre la curva IN-OUT, la SICI/ICF e la SICF sono stati confrontati utilizzando la RM ANOVA.

E' stata effettuata una analisi di regressione lineare per calcolare la inclinazione della curva IN OUT sia nell'esperimento principale che in quello pilota.

Nella RM ANOVA la simmetria dei dati è stata valutata tramite il Mauchly's test ed è stata usata la correzione Greenhouse Geisser. Nel caso di valori p significativi è stata applicata un'analisi post-hoc (test t di Student per dati appaiati con correzione Bonferroni).

E' stato considerato significativo un valore della p inferiore a 0.05. Tutti i valori sono stati espressi come media  $\pm$  deviazione standard.

### 3.2 Risultati

Tutti i pazienti hanno completato l'esperimento principale mentre solo 9 su 11 hanno partecipato all'esperimento pilota perché il paziente A è deceduto e il paziente G ha rifiutato di continuare la sperimentazione.

La maggior parte dei pazienti, 7 su 11, riferiva dolore neuropatico come unico sintomo. La valutazione della conduzione nervosa standard tuttavia è risultata normale in tutti i pazienti.

Due pazienti (il paziente A e M) hanno avuto di eventi cerebrovascolari documentati.

La risonanza magnetica encefalica convenzionale (immagini T1, T2 e flair) è stata eseguita in tutti i pazienti e 9 su 11 non avevano alcuna lesione. Nei pazienti A e F la risonanza magnetica encefalica ha mostrato un diffuso interessamento lacunare infartuale e leucoaraiosi; un infarto cerebellare emisferico nel paziente A. L'esame neurologico era normale in tutti i soggetti eccetto che nel paziente A che presentava una sindrome cerebellare lieve a destra con dismetria e ipotonia. I 9 pazienti che sono stati rivalutati al T1 non hanno riferito alcun sintomo clinico aggiuntivo. Inoltre l'esame neurologico e la risonanza magnetica encefalica non erano cambiati.

Non vi erano differenze per quanto riguarda la RMT ( $50.8 \pm 8.0\%$  *versus*  $49,6 \pm 9.3\%$ ;  $p = 0.75$ ) e la AMT ( $42.8 \pm 5.9\%$  *versus*  $43.0 \pm 8.2\%$ ;  $p = 0.95$ ) fra pazienti e controlli.

L'intensità media capace di evocare 1 mV MEP era  $55.9 \pm 11.0\%$  nei pazienti e  $58.0 \pm 11.0\%$  nei controlli (Student's unpaired *t*-test:  $p = 0.66$ ). Non sono state riscontrate differenze significative fra pazienti e controlli nel CMCT ( $7.9 \pm 1.1$  ms *versus*  $7.8 \pm 2.0$  ms rispettivamente,  $p = 0.50$ ) e nel cSP ottenuto con intensità di stimolo del 120% della RMT (pazienti:  $133.7 \pm 32.6$  ms; controlli:  $131.3 \pm 24.5$  ms;  $p = 0.85$ ) e del 150% della RMT (pazienti:  $179.5 \pm 20.6$  ms; controlli:  $174.0 \pm 24.1$  ms;  $p = 0.58$ ) rispettivamente.



## **IN-OUT**

L'analisi della varianza con rmANOVA a due vie, su pazienti e controlli (GROUPS) e le intensità (110, 120, 130, 140 e 150% della RMT) ha evidenziato un effetto significativo delle intensità ( $F_{(1.38, 27.5)} = 49.9$ ,  $p < 0.0001$ ), e un significativo effetto dei gruppi ( $F_{(1, 20)} = 8.5$ ,  $p = 0.009$ ) e una significatività nell'interazione GROUPS\*TMS INTENSITIES ( $F_{(1.38, 27.5)} = 3.64$ ,  $p = 0.03$ ). L'analisi post hoc ha evidenziato differenze significative fra ampiezza media del MEP ottenuta nei pazienti e nei controlli a 110% ( $p = 0.009$ ), 120% ( $p = 0.01$ ), 130% ( $p = 0.009$ ), 140% ( $p = 0.009$ ) e 150% ( $p = 0.02$ ) della RMT (Figure 1A, 2A). La comparazione dei coefficienti di regressione fra le due curve ha mostrato differenza significativa ( $T: 13.78$ ;  $p=0.0001$ );

## **SICI/ICF**

L'analisi della varianza con rmANOVA a due vie, su pazienti e controlli (GROUPS) e SICI/ISIs (Test, 1 and 2.5 ms) ha mostrato un effetto significativo solo degli ISIs ( $F_{(2, 40)} = 105.5$ ,  $p < 0.0001$ ). L'analisi post hoc ha mostrato una inibizione significativa a ISI = 1 ms ( $p < 0.0001$ ) e 2.5 ms ( $p < 0.0001$ ) per i pazienti e una inibizione significativa a ISI = 1 ms ( $p < 0.0001$ ) e 2.5 ms ( $p < 0.0001$ ) nei controlli. Non vi era effetto dei GROUPS o nell'interazione fra GROUPS and ISIs (Figure 1B, 2B).

La stessa analisi applicata alla ICF ha mostrato un effetto significativo di ISIs ( $F_{(2, 40)} = 44.6$ ,  $p < 0.0001$ ) e GROUPS ( $F_{(1, 20)} = 4.6$ ,  $p = 0.03$ ) e una significativa interazione fra i due fattori ( $F_{(2, 40)} = 7.79$ ,  $p = 0.001$ ).

L'analisi post hoc ha mostrato facilitazione significativa a 10 e 15 ms per pazienti ( $p < 0.0001$  in entrambi gli ISIs) e controlli ( $p = 0.002$  in entrambi gli ISIs). La comparazione di questi valori fra i due gruppi ha mostrato una differenza significativa a 10 ms ( $p = 0.003$ ) e una differenza quasi significativa a 15 ms ( $p = 0.07$ ) (Figure 1B, 2B).

## **LICI**

L'analisi della varianza con rmANOVA a due vie, su pazienti e controlli (GROUPS) e ISIs (Test, 50, 100, 150, 200 ms) ha mostrato un effetto significativo unicamente per gli ISIs ( $F_{(4, 80)} = 43.4$ ,  $p < 0.0001$ ). L'analisi post hoc ha mostrato una inibizione significativa ( $p < 0.0001$ ) nei quattro intervalli ISIs esaminati (50, 100, 150 and 200 ms) sia nei pazienti che e nei controlli. Non vi era effetto dei GROUPS o interazione fra GROUPS and ISIs.

## **SICF**

L'analisi della varianza con rmANOVA a due vie, su pazienti e controlli (GROUPS) e ISIs (Test, 1.5, 2.5 and 4.3 ms) ha mostrato un effetto significativo degli ISIs ( $F_{(3, 60)} = 25.5$ ,  $p < 0.0001$ ) e GROUPS ( $F_{(1, 20)} = 6.9$ ,  $p = 0.02$ ) e una interazione significativa fra i due fattori ( $F_{(3, 60)} = 3.7$ ,  $p = 0.02$ ). L'analisi post hoc ha mostrato una facilitazione significativa a 1.5, 2.5 e 4.3 ms per i pazienti ( $p < 0.0001$  in all ISIs) ed i controlli (1.5 ms:  $p = 0.006$ ; 2.5 ms:  $p = 0.002$ ; 4.3 ms:  $p = 0.02$ ). La comparazione di questi valori fra i due gruppi ha mostrato differenza significativa a 1.5 ms ( $p = 0.03$ ), 2.5 ms ( $p = 0.02$ ) and 4.3 ms ( $p = 0.03$ ) (Figure 1C, 2C).

## **SAI**

L'analisi della varianza con rmANOVA a due vie, su pazienti e controlli (GROUPS) e ISIs (Test, 19, 20, 21 ms) ha mostrato un effetto significativo degli ISIs ( $F_{(1.9, 38.2)} = 46.6$ ,  $p < 0.0001$ ). L'analisi post hoc ha mostrato una inibizione significativa del MEP ai tre intervalli studiati nei pazienti (19 ms:  $p < 0.0001$ ; 20 ms:  $p < 0.0001$ ; 21 ms:  $p < 0.0001$ ) e controlli (19 ms:  $p < 0.0001$ ; 20 ms:  $p < 0.0001$ ; 21 ms:  $p < 0.0001$ ). Non vi era effetto dei GROUPS o interazione fra GROUPS and ISIs.

## **Effetti della ERT sulla eccitabilità dell'area motoria.**

Nel gruppo A (pazienti trattati) dopo un anno di terapia enzimatica sostitutiva non sono stati registrati cambiamenti significativi nella RMT (T0:  $54 \pm 9.2\%$ ; T1:  $51 \pm 11\%$ ;  $p = 0.74$ ) e AMT (T0:  $43 \pm 5.9\%$ ; T1:  $46 \pm 5.5\%$ ;  $p = 0.43$ ). Anche nel gruppo B (pazienti non trattati) non vi erano differenze nella RMT (T0:  $49 \pm 8.7\%$ ; T1:  $46 \pm 7.6\%$ ;  $p = 0.54$ ) e AMT (T0:  $44 \pm 7.9\%$ ; T1:  $41 \pm 8.2\%$ ;  $p = 0.51$ ) ad un anno.

## **IN-OUT**

Nel gruppo A, L'analisi della varianza con rmANOVA a due vie, con fattori principali TIME (T0 and T1) e TMS INTENSITIES (110, 120, 130, 140 and 150% della RMT) non ha mostrato un chiaro effetto del TIME ( $F_{(1, 4)} = 5.95$ ,  $p = 0.07$ ), ma un significativo effetto per TMS INTENSITIES ( $F_{(4, 16)} = 5.52$ ,  $p = 0.005$ ) e una interazione fra TIME and TMS INTENSITIES ( $F_{(4, 16)} = 4.54$ ,  $p = 0.01$ ). L'analisi post hoc ha mostrato una riduzione significativa del MEP medio al T1 solo all'intensità 150% della RMT ( $p = 0.01$ ) mentre non si registravano significative differenze a 110% ( $p = 0.6$ ), 120% ( $p = 0.5$ ), 130% ( $p = 0.2$ ) e 140% ( $p = 0.1$ ) (Figura 3A).

La comparazione dei coefficienti di regressione fra le due curve ha mostrato una differenza significativa (T: 7.64;  $p = 0.01$ ).

La stessa analisi applicata al gruppo B ha evidenziato unicamente un effetto delle TMS INTENSITIES ( $F_{(4, 12)} = 30.2$ ,  $p < 0.0001$ ), senza effetto del TIME ( $p = 0.42$ ) o interazione fra questi due fattori ( $p = 0.9$ ) (Figure 3A).

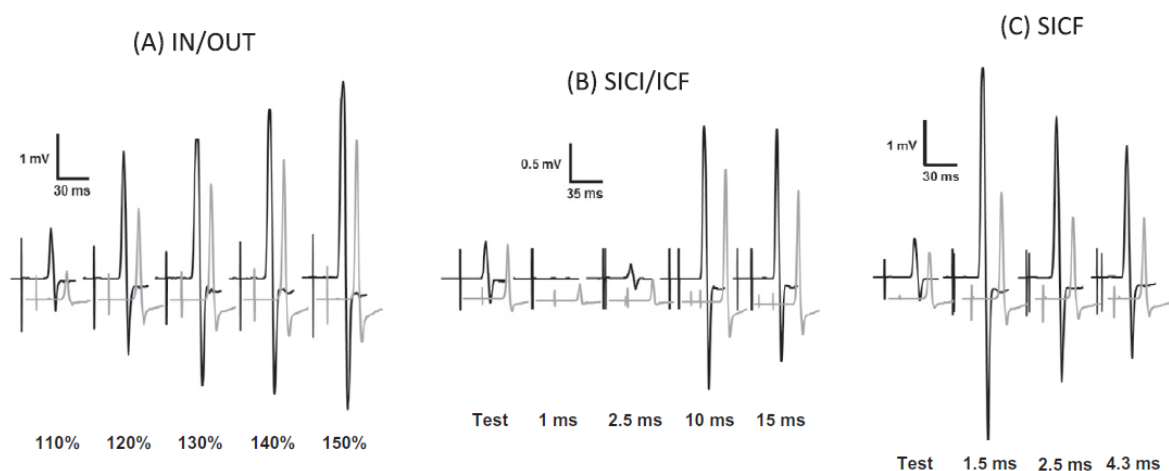
### SICI/ICF

Nel gruppo A l'analisi ha mostrato un significativo effetto del TIME ( $F_{(1, 4)} = 12.2$ ,  $p = 0.02$ ), ISIs ( $F_{(4, 16)} = 39.1$ ,  $p < 0.0001$ ) e una interazione fra TIME e ISIs ( $F_{(4, 16)} = 4.1$ ,  $p = 0.02$ ). L'analisi post hoc ha mostrato una significativa riduzione della ICF al T1 ad entrambi gli intervalli (10 ms:  $p = 0.04$  and 15 ms:  $p = 0.04$ ). Per contro SICI al T0 and T1 non differivano significativamente in nessun intervallo (1 ms:  $p = 0.86$ ; 2.5 ms  $p = 0.92$ ). Nel gruppo B solo l'effetto ( $F_{(4, 12)} = 113.9$ ,  $p < 0.0001$ ) era significativo. Non vi era effetto del TIME ( $p = 0.48$ ) o interazione TIME\*ISIs ( $p = 0.9$ ) (Figura 3B).

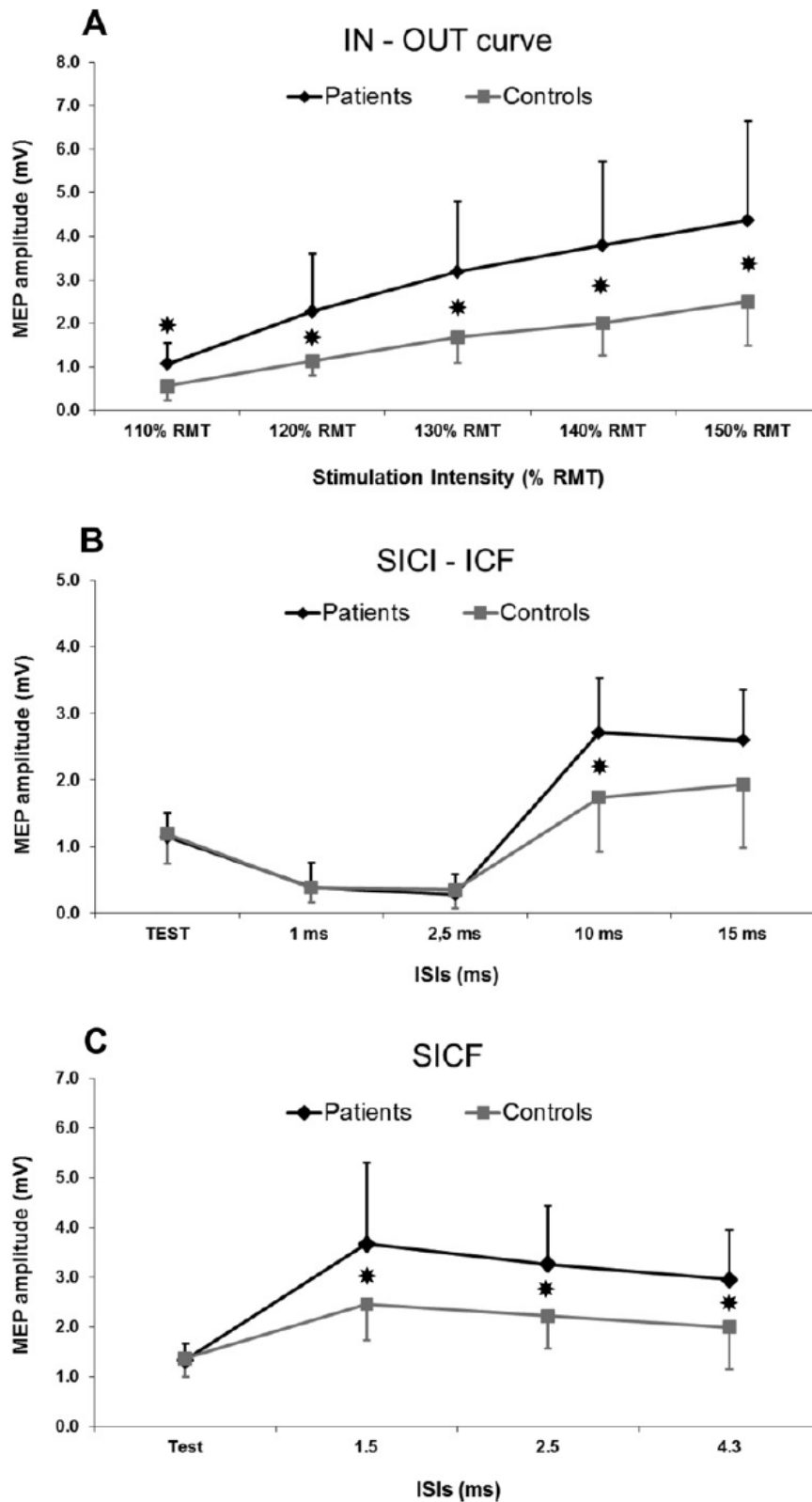
### SICF

Nel gruppo A, vi era un effetto significativo per ISI ( $F_{(3, 12)} = 8.9$ ,  $p = 0.002$ ). L'effetto del TIME era quasi significativo ( $F_{(1, 3)} = 4.7$ ,  $p = 0.09$ ) così come l'interazione TIME - ISIs ( $F_{(3, 12)} = 3.0$ ,  $p = 0.07$ ). Fra i non trattati vi era significativo effetto degli intervalli di stimolo ( $F_{(3, 19)} = 8.8$ ,  $p = 0.005$ ) senza effetto del TIME ( $p = 0.7$ ) o interazione fra questi due fattori ( $p = 0.7$ ) (Figura 3C).

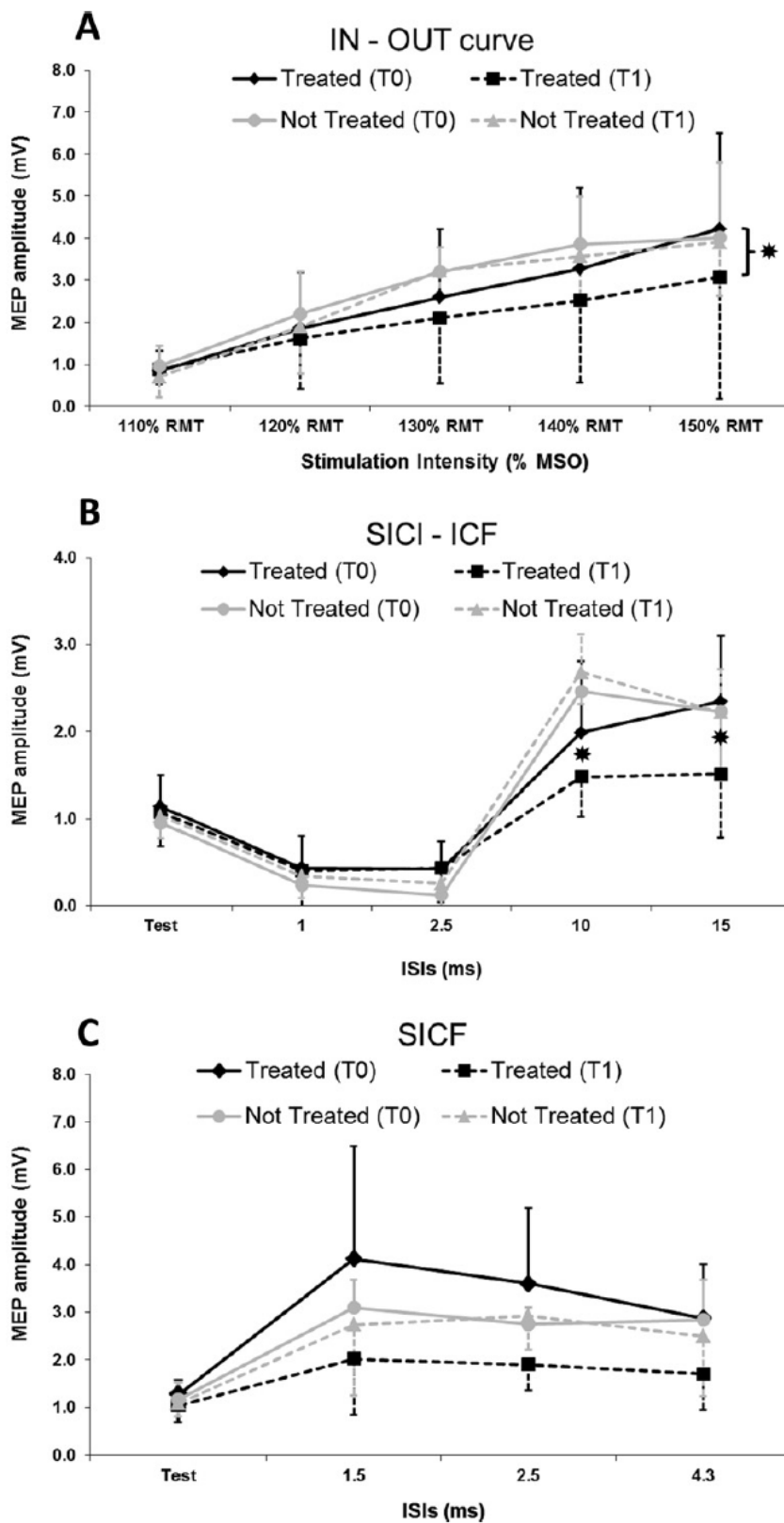
**Figura 1:** Potenziali evocati motori in un paziente (linea nera) e in un controllo (linea grigia). Nel paziente si evidenzia un maggiore MEP nella curva IN-OUT, una maggiore facilitazione in ICF e SICF (Ortu et al., 2013).



**Figura 2:** Ipereccitabilità della corteccia motoria nei pazienti. Confronto fra dati ottenuti sui pazienti (linee nere) e sui controlli (linee grigie) (Ortu et al., 2013).



**Figura 3:** Effetti della ERT sull'eccitabilità motoria al T0 (linee continue) e T1 (linee tratteggiate) in pazienti trattati (linee nere) e non trattati (linee grigie) (Ortu et al., 2013).



### 3.3 Discussione

I risultati del presente studio dimostrano, per la prima volta, la presenza di definite alterazioni neurofisiologiche a livello della corteccia motoria nei pazienti con malattia di Fabry. In particolare l'incremento nelle curve IN-OUT, ICF e SICF suggerisce la presenza di una maggiore eccitabilità della corteccia motoria in questa malattia. Al contrario non è stata osservata nessuna alterazione nella soglia motoria attiva e a riposo, nel tempo di conduzione motorio centrale (CMCT), e nell'attività inibitoria intracorticale (SICI, LICI, cSP) o nella funzione dei circuiti colinergici (SAI). La curva IN-OUT dà una stima globale dell'eccitabilità dell'intera corteccia motoria, andando a studiare l'attività dei neuroni che sono intrinsecamente meno eccitabili o spazialmente più lontani dal centro di attivazione della stimolazione magnetica transcranica (Hallet et al., 1999; Valls-Solè et al., 1994). Al contrario, la soglia motoria fornisce informazioni solo su un piccolo nucleo centrale di neuroni più eccitabili nel contesto della rappresentazione corticale del muscolo target (Di Lazzaro et al, 2003; Ziemann et al. 1996).

I nostri dati documentano un incremento della curva IN-OUT nei pazienti con malattia di Fabry, mentre la soglia motoria non ha mostrato significative differenze fra pazienti e controlli. Questo è molto simile a quanto riscontrato nella malattia di Parkinson (Valls-Solè et al., 1994), nella distonia (Ikoma et al. 1996) e nella sialidosi tipo 1 (Huang et al., 2008).

E' probabile che la stimolazione magnetica transcranica a intensità soprasoglia possa essere capace di reclutare più cellule neuronali piramidali dei pazienti affetti da queste condizioni rispetto ai soggetti sani (Huang et al., 2008).

La curva ICF, invece, si pensa sia utile nella valutazione del grado di eccitabilità dei circuiti eccitatori nella corteccia motoria, mediati dalla trasmissione glutammatergica. La consistenza di questo meccanismo neurochimico è principalmente supportato da studi che dimostrano un decremento della curva ICF indotto dagli antagonisti NMDA (Schwenkreis et al. 1999; Ziemann et al. 1998b). Nei nostri pazienti con malattia di Fabry, la ICF è incrementata significativamente, mentre nella sialidosi tipo I Wang et al (2008) non hanno trovato cambiamenti nella ICF ma solo nella SICI, che era ridotta. Nei pazienti con sialodosi di tipo 1, anche il cSP era ridotto (Huang et al.,2008), mentre nella malattia di Fabry sia il cSP che la SICI non erano alterati. Inoltre sia nella sialidosi tipo 1 che nella malattia di Fabry, la soglia motoria e il CMCT non erano alterati, ma questi parametri elettrofisiologici sono stati trovati alterati in circa il 70 % dei pazienti asintomatici con malattia di Gaucher (aumento della soglia motoria e prolungata CMCT), dato che indica come un coinvolgimento del sistema nervoso sia comune in questa malattia (Perretti et al. 2005).

Questi risultati indicano che mentre l'incremento di eccitabilità della corteccia motoria nella malattia di Fabry è principalmente dovuto a un' aumentata attività dei circuiti glutamatergici eccitatori, nella sialidosi tipo 1 è principalmente dovuta a un interessamento dei circuiti corticali inibitori. Queste differenze nelle alterazioni elettrofisiologiche e biochimiche possono parzialmente spiegare le differenti caratteristiche cliniche di queste malattie. In particolare l'incremento della attività dei circuiti glutamatergici della corteccia motoria nella malattia di Fabry conferma i risultati di un recente studio che ha evidenziato un'aumentata prevalenza di epilessia nei pazienti affetti da malattia di Fabry rispetto alla popolazione generale (Ginsberg, 2006).

Inoltre considerando che il glutammato è un trasmettitore essenziale nella via del dolore sia nel sistema nervoso centrale che periferico (Rogoz et al., 2012), si può ipotizzare che le alterazioni documentate possano giocare un ruolo nella patogenesi del dolore neuropatico nella malattia di Fabry. Nei pazienti con sialidosi tipo 1 invece, l'eccitabilità aumentata e la ridotta inibizione in certe vie corticali motorie, principalmente correlate a una attività anormale GABA-A, può prontamente spiegare l'aumento di casi di epilessia mioclonica progressiva e di alcune forme di mioclono come quello posturale (Matsumoto et al., 2000). Invece, la soglia motoria significativamente aumentata e il prolungato CMCT documentati nella maggior parte dei pazienti con malattia di Gaucher, può essere dovuta sia a disfunzione della corteccia motoria che ad un'alterata modulazione nella corteccia motoria da parte dei gangli della base (Perretti et al., 2005).

Recenti report clinici indicano che c'è una alterata attività della glucocerebrosidasi nel sistema nervoso centrale, anche nei pazienti eterozigoti per malattia di Gaucher, i quali possono essere più a rischio di sviluppare una malattia di Parkinson (Tayebi et al., 2003). Presi insieme questi dati suggeriscono che le alterazioni documentate nella corteccia motoria nelle malattie lisosomiali sono verosimilmente supportati da differenti meccanismi fisiopatologici. Ciò non deve sorprendere poiché nelle malattie lisosomiali la fisiopatologia dei disordini è principalmente determinata dalla natura chimica del composto che viene accumulato e dal tipo e dallo spettro delle cellule nelle quali avviene l'accumulo patologico (Futerman e Van Meer, 2004). Inoltre, dato che nella malattia di Fabry sia la vasculopatia cerebrale che l'accumulo di glicosfingolipidi nelle cellule gliali e neuroni sono diffusi all'intero encefalo, è verosimile che le alterazioni elettrofisiologiche biochimiche che sono state documentate nella corteccia motoria dei pazienti con malattia di Fabry possono essere presenti in altre regioni cerebrali.

Nel nostro studio, inoltre, abbiamo documentato che il parametro SICF era aumentato nei pazienti con malattia di Fabry. La SICF permette di esplorare i circuiti della corteccia motoria coinvolti nella generazione dell'onda I (Ziemann et al., 1998a; Hanajima et al., 2002), tuttavia l'esatto meccanismo di come ciò funzioni non è ancora completamente noto. E' diffusamente accettato che l'onda I origini nella corteccia motoria per attivazione sinaptica dei neuroni corticospinali attraverso interneuroni eccitatori regolati tramite connessioni interneuronali inibitorie (Ziemann e Rothwell, 2000; Esser et al., 2005). In particolare, è noto che SICF rifletta una risposta eccitatoria indotta da uno stimolo subliminare del segmento iniziale degli interneuroni eccitatori, che sono stati precedentemente depolarizzati da un potenziale postsinaptico eccitatorio evocato da un impulso precedente sopra soglia (Hanajima et al. 2002; Ortu et al., 2008).

Mentre il ruolo del recettore del GABA A nella modulazione della SICF è stato dimostrato con chiarezza (Ziemann et al., 1998a), si hanno minori conoscenze circa i neurotrasmettitori eccitatori coinvolti. Alcune evidenze suggeriscono un ruolo per il glutammato, considerando che questo è il neurotrasmettitore eccitatorio più diffuso del sistema nervoso centrale, è che i suoi recettori short lasting AMPA si adattano bene alle proprietà dell'onda I con scarica ripetitiva ad alta frequenza (Di Lazzaro et al., 2003; Esser et al., 2005; Di Lazzaro et al., 2012). Non è noto tuttavia come possa configurarsi un'alterazione dei circuiti eccitatori glutammatergici nella corteccia motoria dei pazienti con malattia di Fabry.

Il glutammato è conservato principalmente nelle vescicole nel neurone presinaptico, e dopo il rilascio nello spazio sinaptico, va a legarsi a specifici recettori neuronali postsinaptici (Sofroniev e Vinters, 2010).

Per mantenere il cervello e la sua funzione è essenziale mantenere basse concentrazioni extracellulari di glutammato, e per fare questo, il ruolo degli astrociti nel ripulire lo spazio sinaptico dal glutammato è cruciale (Newman, 2003).

Si può pensare che i depositi di glicosfingolipidi possono alterare la funzione sia dei neuroni eccitatori che degli astrociti portando alle alterazioni dei parametri neurofisiologici che abbiamo riscontrato.

I depositi di glicosfingolipidi sono stati trovati sia nei neuroni che negli astrociti in alcune regioni cerebrali inclusa la corteccia frontale (Tubira et al., 1974; deVeber et al., 1992). Comunque un danno diretto dei neuroni e degli astrociti per l'accumulo dei glicosfingolipidi sembra improbabile secondo diversi autori, è questo potrebbe non avere effetti rilevanti sulla clinica e sulla storia naturale della malattia (Moore et al., 2007; Bersano et al., 2012). Invece si pensa che nella MF l'accumulo progressivo di glicosfingolipidi nell'endotelio vascolare e



nelle cellule muscolari lisce, porti a una alterazione nella circolazione locoregionale dell'encefalo e quindi ad una conseguente ischemia e progressivo danno cerebrovascolare in età precoce (Moore et al., 2007; Zarate e Hopkin, 2008; Bersano et al., 2012). In questo contesto, nella corteccia motoria dei pazienti con malattia di Fabry, è probabile che vi sia una riduzione della capacità di riassorbimento del glutammato da parte degli astrociti danneggiati dall'ischemia, con conseguente aumento della concentrazione del glutammato extracellulare (Rossi et al., 2007; Sofroniev e Vinters, 2010). In ogni modo, l'ischemia, causando una perdita del gradiente ionico, può anche indurre il rilascio di glutammato dalle cellule neuronali (Bersano et al., 2012). In aggiunta, è stato suggerito che la down-regulation dei trasportatori del glutammato dopo il periodo di ischemia, o la disfunzione indotta dall'ossidazione, possono contribuire all'accumulo di glutammato extracellulare (Camacho e Massieu, 2006). Sieber e collaboratori (1995) in uno studio neuropatologico, hanno messo in evidenza come l'ischemia causi primariamente un danno neuronale nelle regioni corticali, senza necrosi e infarto, mentre il danno delle aree sottocorticali è meno severo nonostante ci sia una riduzione simile nella perfusione cerebrale regionale. Ulteriori studi neurofisiologici nell'uomo hanno confermato i dati sperimentali su animali che evidenziavano cambiamenti nella eccitabilità delle aree cerebrali lontane da lesione ischemica, in particolare, nella corteccia motoria dell'emisfero non affetto si osservava sia una riduzione dell'attività inibitoria che un incremento dell'attività eccitatoria, probabilmente dovuta a sbilanciamento fra i circuiti intracorticali inibitori ed eccitatori (Shimizu et al., 2002; Butefisch et al., 2003; Swaine et al., 2008). Abbiamo ipotizzato che la maggiore eccitabilità della corteccia motoria nei pazienti con malattia di Fabry documentata in questo studio sia un correlato neurofisiologico di tutti questi eventi patologici.

Come spiegato nella tabella 1 un paziente affetto da malattia di Fabry incluso in questo studio aveva avuto sia dei TIA sia un infarto cerebellare (paziente A); un altro ha avuto un TIA (paziente M).

La risonanza magnetica nucleare encefalica era normale in 9 pazienti. Era invece evidente un diffuso danno lacunare con leucoaraiosi in due pazienti (A ed F).

L'ipereccitabilità della corteccia motoria era dunque evidente anche nei pazienti senza lesioni alla risonanza magnetica. Questo non deve sorprendere poiché è stato dimostrato che il processo fisiopatologico nella malattia di Fabry parte molti anni prima delle manifestazioni cliniche (Zarate e Hopkin, 2008). Studi utilizzando tomografia ad emissione di protoni (Moore et al., 2003) e spettroscopia RM. (Tedeschi et al., 1999; Marino et al., 2006), suggeriscono che nel contesto di tali lesioni strutturali possono essere riscontrate alterazioni metaboliche,

confermano questa teoria.

Interessante notare come un'abnorme eccitabilità corticospinale è stata anche dimostrata nei pazienti con danno anossico, traumatico e con diffuso danno cerebrale non traumatico per coinvolgimento dei circuiti corticali inibitori, con SICI significativamente ridotto e tale riduzione era correlata alla severità del danno encefalico (Lapitskaya et al., 2013).

Nei nostri pazienti con malattia di Fabry il parametro SICI era normale. Ciò può essere correlato al basso ammontare delle lesioni nelle strutture cerebrali in questi pazienti e come discusso prima può essere indicativo di un preminente contributo dei circuiti eccitatori nella generazione dell'eccitabilità abnorme documentata nel nostro studio.

Nell'esperimento pilota, nel quale abbiamo analizzato l'effetto di un anno di terapia enzimatica sostitutiva sull'eccitabilità corticale, abbiamo osservato una significativa riduzione dell'ipereccitabilità della corteccia motoria rispetto ai valori basali. Dato che l'enzima non è capace di attraversare la barriera ematoencefalica questo trend è probabilmente dovuto a un incremento del flusso cerebrale dopo un anno di terapia enzimatica sostitutiva (Moore et al., 2002; Das e Naim, 2009; Bersano et al., 2012). Comunque, date le piccole dimensioni dello studio, il risultato ottenuto è da considerarsi preliminare, e richiede conferme in un campione più grande.

In conclusione, I nostri dati indicano l'utilità della stimolazione magnetica transcranica nello studio di lesioni encefaliche biochimiche in fase iniziale e pertanto potenzialmente reversibili nei pazienti con malattia di Fabry. Il fatto che vi sia una riduzione dell'ipereccitabilità nella corteccia motoria in 5 pazienti dopo la terapia enzimatica sostitutiva dovrebbe motivare l'estensione della valutazione neurofisiologica a un gruppo più ampio di pazienti per valutare il possibile uso di questa metodica nel monitoraggio del corso di malattia e della risposta alla terapia nella pratica clinica.

## 4. Studio biochimico: Fabry e glicosaminoglicani

Il coinvolgimento renale (proteinuria e/o insufficienza renale nei suoi vari gradi di gravità) è una delle maggiori cause di morbilità e mortalità nella malattia di Fabry.

Il danno sembra essere principalmente causato da una diffusa deposizione di glicosfingolipidi nei glomeruli, nei tubuli e nei vasi renali. Nella comune pratica clinica i biomarker utilizzati sono la proteinuria e la microalbuminuria. (Breunig e Wanner, 2008) Recentemente, nel paziente affetto da MF, sono state utilizzati molti nuovi marcatori, inclusi GB3 e specifiche proteine come la n-acetil beta glucosamina e la cistatina C, per facilitare il piano terapeutico e decisionale nella pratica clinica (Schiffmann et al., 2008; Torralba Cabeza et al., 2011).

Tuttavia l'efficacia dei biomarcatori attualmente in uso per il monitoraggio della nefropatia di Fabry è ancora infase di studio.

Diversi studi hanno evidenziato variazioni dei glicosaminoglicani plasmatici e urinari in condizioni fisiologiche e patologiche. I glicosaminoglicani (GAGs) sono dei polisaccaridi lineari e complessi composti da un numero variabile di unità di disaccaridi ripetute, ciascuna contenente acido esuronico legato a un residuo esosaminico.

I glicosaminoglicani sono presenti in molti tessuti e fluidi biologici come sangue, plasma e urine (Esko et al., 2009). I glicosaminoglicani plasmatici rappresentano una componente di proteoglicani secreti nel sangue principalmente di origine epatica ed endoteliale.

Il condroitin solfato (CS), il principale glicosaminoglicano nel plasma, è derivato sia dalla superficie cellulare che dalla matrice extracellulare. Una porzione del condroitin solfato è covalentemente legata al core proteico per formare la bicunina che è principalmente sintetizzata e secreta dal fegato (Ly et al., 2011). Le catene di CS consistono di 12-18 unità di disaccaridi (Zinellu et al., 2007; Zinellu et al., 2012).

La maggior parte della bicunina circolante è presente come catena leggera della famiglia di molecole delle Inter Alpha inhibitor (IaI) (Zuho et al., 2004). Essa è un inibitore delle serina proteasi e si trova nel plasma così come in molti altri tessuti (Zuho et al., 2004). ed è anche escreta nell'urina (in questo caso ci si riferisce all' inibitore urinario della tripsina o UTI). Nell'urina, i glicosaminoglicani consistono principalmente di eparan solfato, condroitinsolfato e in minima quantità dermatan solfato (Esko et al., 2009).

Nella popolazione generale la bicunina può essere incrementata in varie condizioni patologiche caratterizzate da infiammazione cronica inclusi alcuni tumori (Matsukazi et al., 2005), glomerulonefriti croniche (De Muro et al., 2005; De Muro et al., 2007), trapianto renale (De Muro et al., 2013), diabete tipo 1 (De Muro et al., 2006), lupus eritematoso

sistemico (De Muro et al., 2001). Inoltre si riportano variazioni nei livelli di bicunina urinaria durante il fisiologico ciclo mestruale delle donne fertili (De Muro et al., 2009).

La bicunina è stata presa in considerazione come marker per danno renale (Puglia et al., 2007), malattia epatica (De Lin et al., 2004), contusione cerebrale (Sakai et al., 2003), suggerendo una potenziale applicazione nei pazienti con malattia di Fabry.

Dato che il danno renale è una frequente e severa complicazione della malattia di Fabry, abbiamo pensato di valutare i glicosaminoglicani plasmatici e urinari in questa patologia per capire se la loro escrezione urinaria possa rappresentare un utile e precoce marcatore di danno renale nei pazienti con la malattia di Fabry.

## **4.1 Materiali e metodi**

### **4.1.1 Campioni**

Le analisi sono state effettuate su campioni di plasma e di urine del mattino di 24 pazienti con Fabry, di ambo sessi, con un età compresa tra i 20 e 61 anni e 43 controlli sani appaiati per sesso ed età.

In tutti i pazienti la Malattia di Fabry è stata diagnosticata identificando la mutazione nel gene GLA e avendo dimostrato una ridotta attività dell'enzima  $\alpha$ -galattosidasi A nel plasma (Tabella 1).

Tra i pazienti, 13 non presentavano un danno renale; 11 invece hanno presentato per più di tre mesi segni documentati di danno renale (creatinina sierica, proteinuria/microalbuminuria e anomalie dei sedimenti urinari o agli studi di imaging, ultrasonografia renale).

Più nel dettaglio, 5 pazienti con danno renale cronico presentavano solo proteinuria mentre gli altri 6 presentavano un danno renale conclamato. Sia nel gruppo dei pazienti con Fabry che nei controlli sono stati valutati i livelli sierici dei markers classici di infiammazione (VES, proteina C-reattiva e alfa1 e alfa2 globuline).

Lo studio è stato condotto in accordo con i principi etici dell'attuale Dichiarazione di Helsinki e prima dell'arruolamento dei pazienti è stato richiesto un consenso informato.

**Tabella 1:** caratteristiche cliniche e genetiche dei pazienti con la malattia di Fabry. (Lepedda et al. 2013).

Patient	Age	Gender	Renal involvement	GLA mutations	$\alpha$ -Galactosidase A (nmol/mL/h)*	ERT
1	59	F	RD	Cys172Tyr	1.70	Y
2	26	F	RD	Cys172Tyr	4.68	Y
3	30	M	NRD	Cys172Tyr	3.70	Y
4	38	M	NRD	Cys172Tyr	5.30	Y
5	33	M	Proteinuria	Cys172Tyr	2.80	Y
6	27	M	RD	Cys172Tyr	3.40	Y
7	46	F	RD	846_847delTC	3.50	Y
8	24	F	Proteinuria	846_847delTC	3.50	Y
9	20	F	Proteinuria	846_847delTC	3.30	Y
10	58	F	RD	846_847delTC	3.90	Y
11	36	M	Proteinuria	846_847delTC	0.48	Y
12	36	F	NRD	Arg112His	2.80	N
13	61	F	NRD	Gln57Arg	11.10	N
14	62	F	NRD	Gln57Arg	14.80	N
15	23	F	NRD	Gln57Arg	10.40	N
16	58	F	NRD	Gln57Arg	9.80	Y
17	53	F	NRD	Asp313Tyr	15.40	Y
18	52	F	NRD	Arg227Gln	8.10	N
19	31	M	NRD	Arg227Gln	2.50	Y
20	42	M	RD	Arg227Gln	0.10	Y
21	32	M	Proteinuria	Arg227Gln	0.70	Y
22	25	M	NRD	Arg227Gln	2.50	Y
23	19	F	NRD	Arg227Gln	6.60	Y
24	43	F	NRD	IVS3+G>A	9.70	Y

NRD: no renal disease; RD: renal disease; ERT: enzyme replacement therapy; Y: under ERT therapy; N: no ERT therapy.  
\* At the time of diagnosis.

#### 4.1.2 Analisi degli isomeri di condroitin solfato plasmatico.

La purificazione dei glicosaminoglicani (GAGs) è stata eseguita con un metodo preparativo microanalitico descritto in precedenza (Zinellu et al., 2007). In breve, 500 microlitri di plasma venivano sottoposti ad un trattamento proteolitico con papaina.

Gli isomeri di CS plasmatico sono stati isolati per mezzo di una tecnica cromatografica a scambio anionico (DEAE-Sephacel) e precipitati con 5 volumi di etanolo a -20°C per 24 h. In seguito sottoposti a depolimerizzazione con l'enzima condroitin ABC liasi (0.1U per 100 microgrammi di acido esuronico) e i disaccaridi insaturi venivano derivatizzati con 12.5 micromoli/L di di 2-aminoacridone (AMAC).

La separazione dei disaccaridi CS derivatizzati è stata eseguita mediante elettroforesi di carboidrati fluoroforo assistita (fluorophore-assisted carbohydrate electrophoresis - FACE).

Le immagini sono state acquisite per mezzo del sistema Gel Doc XR (Bio-Rad) e analizzate col software Quantity One v4.6.3 (Bio-Rad).

La curva di calibrazione è stata allestita usando isomeri home-made di CS ottenuti da un pool di campioni di plasma testati per contenuto di esuronato (Bitter et al., 1962) e sottoposti all'analisi dei dissaccaridi (Zinellu et al., 2007).

I livelli di CS sono stati riportati come microgrammi di acido esuronico per ml di plasma (microgUA/ml) e la densità di carica di CS è stata valutata come rapporto tra 4-solfato delta-disaccaridi ( $\Delta\text{Di-4S}$ ) e disaccaridi totali insaturi ( $\Delta\text{Di-4S} + \Delta\text{Di-nonS}$ ).

#### **4.1.3 Analisi GAGs/bicunina urinari**

Sono stati raccolti campioni di urine del primo mattino (50 ml) e dopo essere state centrifugate a 3000 g per 15 min a 4°C, i sedimenti costituiti da cellule rotte, tessuti e altri materiali solidi venivano eliminati.

Le frazioni urinarie contenenti GAGs/bicunina sono state ottenute per mezzo della cromatografia a scambio anionico (DEAE-Sepacel resina) (De Muro et al., 2006).

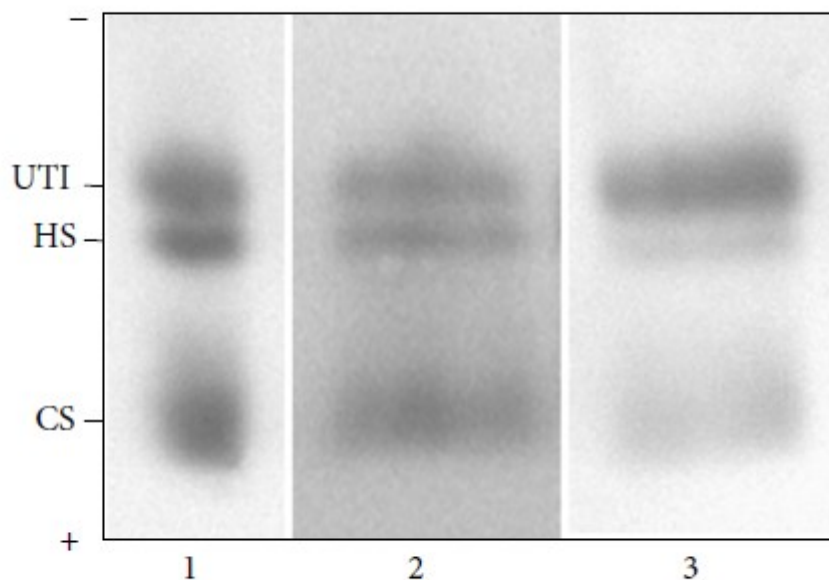
Le urine chiarificate sono state introdotte in una colonna cromatografica impaccata con circa 6 ml di resina, precedentemente equilibrata con un tampone contenente 0.02MTris-HCl, 0.15MNaCl (pH 8.6).

Dopo un lavaggio esaustivo i GAGs/bicunina sono stati eluiti con un tampone di corsa contenente 0.02 M di Tris-HCl, 2 M LiCl (pH 8.6) e testate per contenuto di esuronato col metodo di Bitter e Muir (Bitter e Muir, 1962).

I livelli di esuronato sono stati normalizzati per concentrazione di creatinina urinaria, precedentemente determinato col metodo di Jaffè.

La composizione di GAGs/bicunina urinaria è stata determinata per elettroforesi discontinua su piastre di acetato di cellulosa (figura 1) (De Muro et al., 2005; De Muro et al., 2007; De Muro et al., 2013; De Muro et al., 2006; De Muro et al., 2009) secondo Capelletti et al.(1979).

**Figura 1** Profilo elettroforetico su acetato di cellulosa di GAGs/UTI da un controllo sano (linea 2), paziente con MF e RD (linea 3). Linea 1: mix di standard e GAGs/UTI. (Lepedda et al., 2013).



Gli analiti sono stati separati per mezzo di tre passaggi elettroforetici. Nel primo step le elettroforesi sono state eseguite applicando una corrente di 5mA per circa 6 min e in seguito incubando le piastre in bario acetato 0.1 M a pH 5.0 per 2 min.

Nel secondo step elettroforetico si è utilizzata una corrente di 15 mA per 14 minuti e in seguito la piastra è stata imbevuta di tampone bario acetato 0.1 M a pH 5.0 contenente il 15% di etanolo (v/v) per 2 minuti. Il terzo passaggio elettroforetico è stato condotto con una corrente di 12 mA per 17 minuti.

Infine, il profilo elettroforetico è stato rivelato mediante colorazione con Alcian Blue 0.1 % (w/v) e le immagini sono state acquisite per mezzo del densitometro calibrato GS-800 (Bio-Rad). I GAGs sono stati espressi con relativi valori percentuali.

Le frazioni GAGs/bikunina sono state valutate utilizzando la SDS-PAGE seguita dalla colorazione con Blu Brillante Comassie G 250 (Zinellu et al.,2010) sia per il contenuto nelle urine di bikunina che per i frammenti di bikunina su campioni non trattati e dopo digestione con condroitina ABC liasi.

Quest'ultimo è stato eseguito in tampone contenente acetato d'ammonio 0,1 M (pH 8.0) e utilizzando la liasi condroitin ABC (Sigma Aldrich) per 100 microg di esuronato a 37°C per

una notte. I campioni venivano addizionati con tampone-SDS contenente Tris 250 mM (pH 6.8), 8% SDS (w/), 85 DTT (w/v), 40% di glicerolo (v/v) e blu di bromofenolo 0.0008 % (v/v) e bolliti per 5 minuti prima della elettroforesi.

La bicunina urinaria è stata risolta su un gel da 1 mm 15%T, 3% C su un apparato da elettroforesi verticale Mini Protean II: L'elettroforesi è stata eseguita a 50 V per 5 min e in seguito a 150 V fino a quando il colorante bromofenolo non raggiungeva il limite inferiore del gel.

Quindi i gel venivano fissati con etanolo al 30% (v/v), acido fosforico al 2% (v/v) per 1 ora, lavati due volte in acido fosforico al 2 % (v/v) per 10 min, equilibrati in etanolo al 18 % (v/v), acido fosforico al 2 % e solfato d'ammonio al 15 % (w/v) per 30 min e quindi colorati con la stessa soluzione contenente Blu Brillante Comassie G-250 al 0.02 % (w/v) per 48 ore.

Le immagini del gel venivano acquisite con l'utilizzo del densitometro calibrato (Bio-Rad) ad una risoluzione di 63 micrometri.

#### **4.1.4 Analisi statistiche**

Per comparare i livelli di GAGs urinari e plasmatici tra i pazienti Fabry e i controlli è stato utilizzato il test del t di Student per campioni non appaiati per mezzo del software Sigma Stat 3 (Systat Software).

Per valutare l'associazione tra i livelli di CS e UTI nel plasma e tra i livelli di creatinina e UTI nel siero è stata eseguita la correlazione di Pearson.

La significatività è stata fissata a  $P < 0.05$ .



## Risultati

L'analisi quali-quantitativa dei glicosaminoglicani è stata condotta su plasma e urine delle 24 ore nei pazienti con malattia di Fabry e in 43 soggetti sani di controllo. I pazienti sono stati suddivisi in pazienti con danno renale (RD) e di questi, con sola proteinuria (Torralba-Cabeza et al., 2011) o con danno renale manifesto (Esko et al., 2009), e pazienti senza danno renale (NRD), (De muro et al., 2007). I risultati delle analisi quali-quantitative con particolare riguardo alle urine sono riportati in Tabella 2 e Figura 2.

**Tabella 2:** Livelli urinari di GAGs/UTI e loro distribuzione nei pazienti con malattia di Fabry e nei controlli sani. (Lepedda et al., 2013).

	All patients (n = 24)	RD patients (n = 11)	NRD patients (n = 13)	controls (n = 43)	All patients versus controls ( <b>P</b> )	RD patients versus NRD patients ( <b>P</b> )	RD patients versus controls ( <b>P</b> )	NRD patients versus controls ( <b>P</b> )
Uronic acid ( $\mu\text{g}_{\text{UA}}/\text{mg Cr}$ )	3.83 ± 1.69	4.61 ± 1.63	2.60 ± 0.88	2.59 ± 1.59	<b>0.03</b>	<b>0.009</b>	<b>0.004</b>	0.99
UTI (%)	52.8 ± 20.9	63.2 ± 18.3	36.6 ± 12.9	28.5 ± 17.6	<b>0.0009</b>	<b>0.004</b>	<b>&lt;0.0001</b>	0.29
HS (%)	20.1 ± 9.1	17.4 ± 10.0	24.4 ± 5.6	30.3 ± 9.3	<b>0.003</b>	0.113	<b>0.002</b>	0.14
CS (%)	27.0 ± 14.4	19.4 ± 9.0	39.0 ± 13.2	41.2 ± 11.9	<b>0.004</b>	<b>0.002</b>	<b>&lt;0.0001</b>	0.70
UTI ( $\mu\text{g}_{\text{UA}}/\text{mg Cr}$ )	2.29 ± 1.79	3.15 ± 1.79	0.93 ± 0.44	0.82 ± 0.81	<b>0.005</b>	<b>0.006</b>	<b>0.0001</b>	0.74
HS ( $\mu\text{g}_{\text{UA}}/\text{mg Cr}$ )	0.66 ± 0.26	0.67 ± 0.28	0.63 ± 0.24	0.72 ± 0.37	0.57	0.77	0.71	0.58
CS ( $\mu\text{g}_{\text{UA}}/\text{mg Cr}$ )	0.89 ± 0.36	0.79 ± 0.23	1.03 ± 0.50	1.04 ± 0.65	0.38	0.18	0.23	0.97

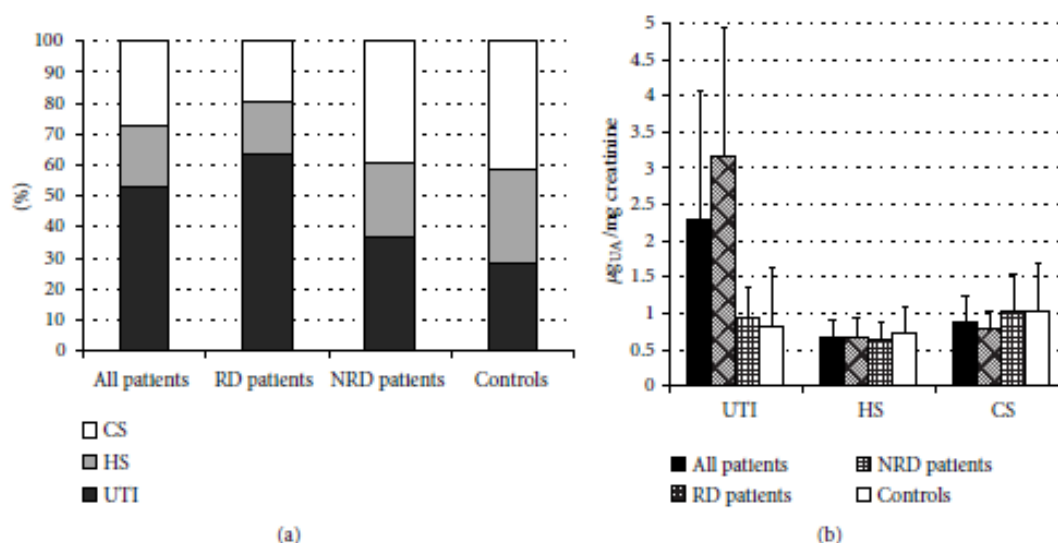
GAGs/PGs levels are reported as  $\mu\text{g}$  of uronic acid (UA) per mg of creatinine.

UTI: HS and CS levels are calculated from total UA content and relative percentages of each GAG.

RD: renal disease (proteinuria/renal damage); NRD: no renal disease.

Significant differences are reported in bold ( $P < 0.05$ ).

**Figura 2:** diagrammi che riportano in percentuale (a) e i livelli (b) dell'inibitore di tripsina urinaria (UTI), eparan solfato (HS) e condroitin solfato (CS) nella totalità dei pazienti, dei pazienti con danno renale (RD), dei pazienti senza danno renale (NRD) e nei controlli. UA: acido uronico. (Lepedda et al., 2013).



Il contenuto di esuronato rivelato dall'analisi ha evidenziato un più alto contenuto urinario di glicosaminoglicani (+48%) nel gruppo dei pazienti rispetto ai controlli (p=0.03). Dopo la divisione in due gruppi, risultava evidente che le maggiori differenze trovate erano ascrivibili a un danno renale, dato che nel gruppo NRD i pazienti non avevano livelli di glicosaminoglicani urinari significativamente differenti dai controlli (p=0.99).

L'analisi qualitativa effettuata mediante elettroforesi su acetato di cellulosa (figura 1) e successiva analisi d'immagine, ha permesso di valutare le varie frazioni di glicosaminoglicani purificati dalle urine e in particolare biconina (UTI), HS e CS. Il gruppo dei pazienti ha mostrato delle lievi differenze nel profilo elettroforetico rispetto ai controlli (tabella; figura 2). Dopo integrazione, i risultati delle analisi quali-quantitative hanno evidenziato livelli di biconina urinaria 2,8 volte più alti nei pazienti rispetto ai controlli (P=0.05).

E' interessante notare come questa differenza fosse significativa per i pazienti con danno renale, che avevano livelli di biconina urinaria 3,8 volte più elevati rispetto ai soggetti di controllo (P=0.001).

Per valutare se i livelli di biconina urinaria nei pazienti con danno renale fosse associata con il grado di danno renale, i risultati per i pazienti con danno renale sono stati analizzati dopo la divisione fra pazienti con sola proteinuria oppure con danno renale manifesto (IRC).(Tabella 3 Figura 3).

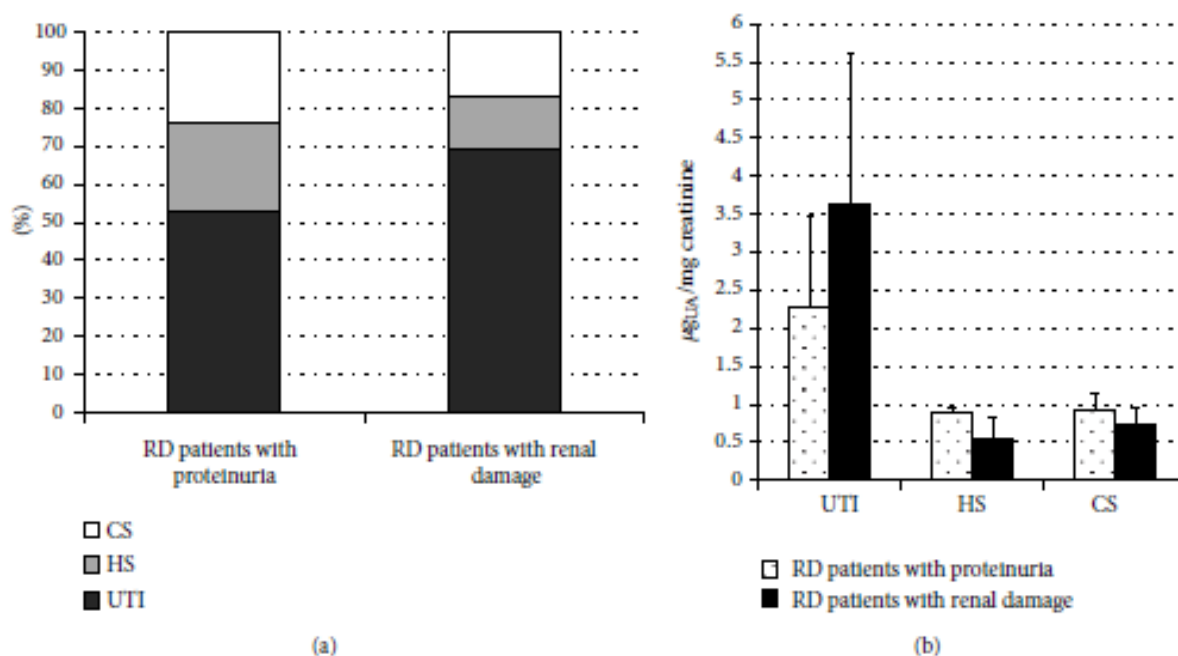
**Tabella 3:** Livelli di GAGs/UTI urinari e loro distribuzione nei pazienti con Fabry che presentavano sia proteinuria che danno renale. (Lepedda et al., 2013).

	RD patients with proteinuria (n = 5)	RD patients with renal damage (n = 6)	(P)
Uronic acid ( $\mu\text{g}_{\text{UA}}/\text{mg Cr}$ )	4.08 $\pm$ 1.40	4.91 $\pm$ 1.77	0.44
UTI (%)	52.7 $\pm$ 13.6	69.2 $\pm$ 18.8	0.16
HS (%)	23.8 $\pm$ 8.9	13.8 $\pm$ 9.2	0.11
CS (%)	23.5 $\pm$ 4.8	17.0 $\pm$ 10.3	0.27
UTI ( $\mu\text{g}_{\text{BUA}}/\text{mg Cr}$ )	2.27 $\pm$ 1.19	3.64 $\pm$ 1.96	0.24
HS ( $\mu\text{g}_{\text{BUA}}/\text{mg Cr}$ )	0.88 $\pm$ 0.07	0.55 $\pm$ 0.29	0.05
CS ( $\mu\text{g}_{\text{BUA}}/\text{mg Cr}$ )	0.92 $\pm$ 0.21	0.72 $\pm$ 0.22	0.18

GAGs/PGs levels are reported as  $\mu\text{g}$  of uronic acid (UA) per mg of creatinine.

UTI: HS and CS levels are calculated from total UA content and relative percentages of each GAG.

**Figura 3:** diagrammi che riportano in percentuale (a) e i livelli (b) dell'inibitore di tripsina urinaria (UTI), eparan solfato (HS) e condroitin solfato (CS) nei pazienti con danno renale (RD) con proteinuria e in pazienti con danno renale conclamato. UA: acido uronico. (Lepedda et al., 2013).



A questo proposito, non sono state evidenziate altre differenze fra i livelli di glicosaminoglicani o bicunina, e differenze nella loro distribuzione fra i due sub gruppi. Ciò indica che l'aumento di escrezione di bicunina nei pazienti con danno renale è probabilmente dovuta a un evento biochimico precoce che interviene all'inizio del danno renale.

Per verificare se la bicunina urinaria fosse strutturalmente intatta, abbiamo utilizzato la SDS PAGE analysis sulle frazioni di glicosaminoglicani/bicunina insieme e dopo rimozione del condroitinsolfato tramite una condroitin ABC liasi.

A questo riguardo, non c'erano differenze significative nella frammentazione della bicunina nei campioni di urina (Figura 4), inoltre l'analisi in SDS Page ha permesso di confermare i livelli più elevati di bicunina urinaria nei pazienti con danno renale.

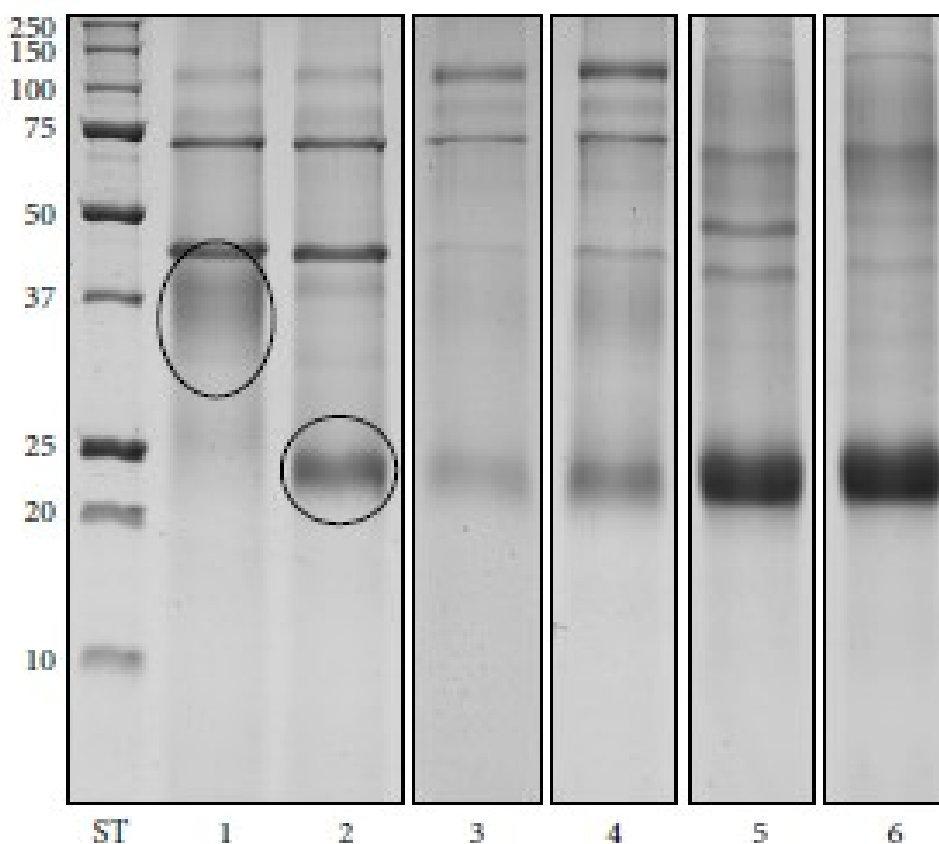
Per esplorare la possibilità che i livelli più elevati di bicunina urinaria nei pazienti potessero essere ascritti almeno in parte a livelli di bicunina plasmatica più alti, abbiamo valutato campioni plasmatici ricercando gli isomeri del CS tramite analisi FACE evidenziando che non vi erano differenze fra pazienti e controlli (Tabella 4, Figure 5 e 6).

Inoltre, non vi era correlazione tra il condroitinsolfato plasmatico ed i livelli di bicunina urinaria (Figura 7), o fra la creatinina sierica e i livelli bicunina urinaria. Un diretto

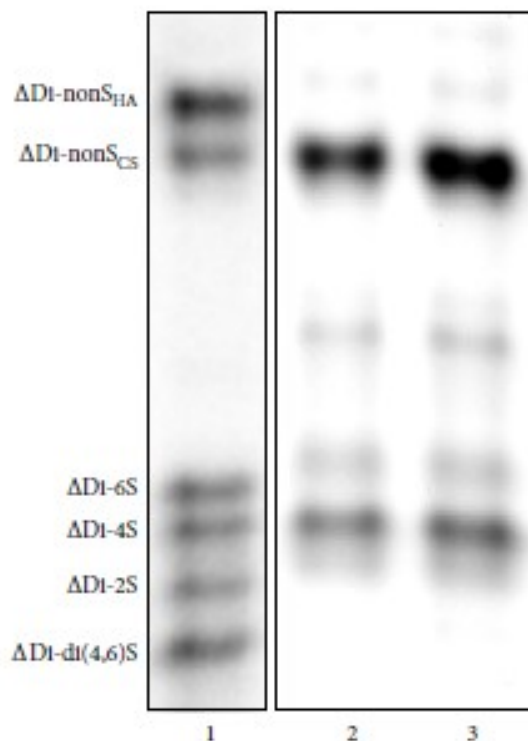
coinvolgimento renale è dunque suggerito dalla escrezione di UTI più alta nei pazienti con MF.

In assenza di chiare infezioni, 11 pazienti con malattia di Fabry su 24 (45,8%) hanno presentato almeno un marcatore di infiammazione sierica alterato (VES, PCR, alfa 1 e Alfa 2 globuline). Questi marcatori erano alterati solo nel 10% dei controlli.

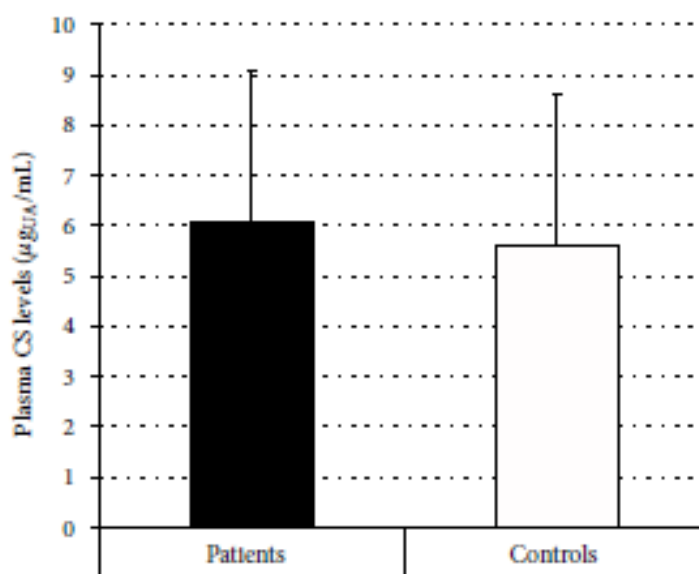
**Figura 4:** Profilo rappresentativo SDS PAGE di frazioni contenenti GAGs non trattati con liasi ABC e trattati con liasi ABC ottenuti dai controlli (linea 2). GAGs contenenti frazioni trattati con liasi dai controlli (linea 3, dai pazienti NRD (linea 4), dai pazienti RD con proteinuria (linea 5) e pazienti RD con danno renale conclamato (linea 6). (Lepedda et al.,2013).



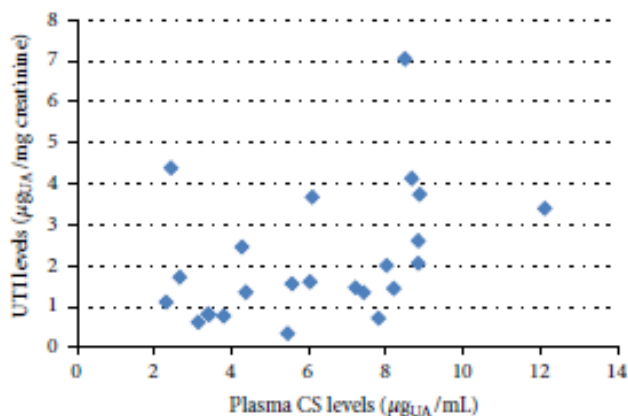
**Figura 5:** Profilo rappresentativo dei disaccaridi insaturi fluoroforo-marcati (FACE)( $\Delta$ Di) ottenuti dagli isomeri di CS plasmatici sia dei controlli (linea 2) che dei pazienti con Fabry (linea 3). Linea 1: miscela di standard  $\Delta$ Di. (Lepedda et al., 2013).



**Figura 6:** Diagramma mostrante i livelli plasmatici di isomeri di condroitin solfato nei pazienti con malattia di Fabry e nei controlli sani. UA: acido uronico (Lepedda et al., 2013).



**Figura 7:** Grafico mostrante i livelli di bicunina urinaria (UTI) in mg di acido uronico (UA) per mg di creatinina in relazione ai livelli di isomeri di condroitin solfato come microgrammi di UA per ml di plasma nei pazienti con malattia di Fabry. (Lepedda et al., 2013).



#### 4.2 Discussione

La malattia di Fabry è un disordine che coinvolge più sistemi e nel quale il progressivo danno renale insieme ad un coinvolgimento del cuore e del sistema nervoso centrale, gioca un ruolo maggiore nel ridurre la qualità è l'aspettativa di vita (Breunig e Wanner, 2008 Schiffmann, 2009).

In uno studio retrospettivo su pazienti con malattia di Fabry con coinvolgimento renale, Branton et al. hanno dimostrato che il 50% dei pazienti presenta proteinuria dai 35 anni di età e il 100% dei pazienti dai 52 anni di età (Branton et al., 2002 ) inoltre il 50% dei pazienti maschi presentano insufficienza renale cronica dai 42 anni di età. Questi autori hanno descritto che dopo lo sviluppo dell'insufficienza renale cronica c'è un rapido declino nella filtrazione glomerulare che porta ad un danno renale in fase avanzata entro 4.1 anni.

La terapia enzimatica sostitutiva sembra rappresentare uno strumento valido per contrastare almeno parzialmente la progressione naturale della malattia in combinazione con trattamenti reno-protettivi come gli ACE-inibitori che sono noti per essere efficaci nel rallentare la progressione della malattia in altre malattie croniche renali con proteinuria (Metha et al., 2009; Warnock e West, 2006).

E' stato anche dimostrato che la terapia enzimatica sostitutiva può essere utile nel preservare la funzione renale normale nei bambini (Riesco et al., 2006).

Nondimeno nella malattia di Fabry la diagnosi di una disfunzione renale precoce è di primaria importanza per aiutare il clinico nel piano decisionale, per programmare gli interventi

terapeutici e seguire la naturale progressione della malattia e gli effetti degli specifici trattamenti (Schiffmann et.al, 2010).

Questo lavoro è il primo report a stabilire che i livelli di bicunina urinaria sono significativamente più alti nei pazienti con MF con danno renale se comparati con i controlli sani. Questi dati suggeriscono che la quantità di questo proteoglicano nelle urine, così come la proteinuria, possa rappresentare un biomarcatore precoce di danno renale nella malattia di Fabry, utile per monitorare la funzionalità renale anche in quei pazienti che non hanno sviluppato un danno renale manifesto.

E' interessante notare come nel nostro studio anche diversi pazienti con malattia di Fabry trattati con terapia enzimatica sostitutiva abbiano mostrato elevati livelli di bicunina nelle urine. Nonostante in questo studio non avessimo inizialmente pianificato un disegno formale mirato a valutare i livelli di bicunina urinaria al tempo zero e dopo un certo periodo di trattamento, questi dati possono supportare alcuni dati clinici indicanti che la terapia enzimatica sostitutiva può cambiare in maniera significativa la progressione naturale della malattia se la terapia è iniziata prima che le lesioni negli organi siano irreversibili (Metha et al., 2009; Ortu et al. 2013).

I livelli di bicunina plasmatici e urinari sono correlati alla sua attività antiinfiammatoria (Pugia et al., 2007), e diversi studi hanno associato elevati livelli di questo proteoglicano in plasma and urine con diverse malattie che mostrano infiammazione cronica (Matsukazi et al., 2005; De Muro et al.,2005; De Muro et al., 2007; De Muro et al., 2013; De Muro et al., 2001; De Muro et al., 2006).

E' importante notare come ci sia ricorrenza di episodi febbrili di origine non nota in alcuni pazienti con MF e la presenza di alterati livelli di VES, PCR, alfa 1 e Alfa 2 globulina (45,8% dei pazienti con MF). Questo indica probabilmente che in questa patologia è presente un'infiammazione locale e sistemica (Vedder et al., 2009; Kikumoto et al., 2010).

L'attivazione della via biochimica infiammatoria nella MF, che può presentarsi anche in altri disordini da accumulo lisosomiale, è probabilmente correlata a una inappropriata attivazione secondaria del sistema immunitario, in risposta all'accumulo, con conseguente infiammazione cronica (Futerman et al., 2004; Vitner et al., 2010).

E' risaputo che nelle malattie da accumulo lisosomiale l'infiammazione sistemica contribuisce alla patogenesi, precedendo l'esordio dei segni clinici, e può determinare la comparsa nel plasma e nelle urine di metaboliti secondari i quali possono agire come biomarcatori che possono così essere utili per il follow-up dei pazienti e della malattia e diventare a loro volta un target per una terapia aggiuntiva (Futerman et al., 2004; Vitner et al., 2010).

E' importante inoltre ricordare che nella malattia di Fabry la terapia enzimatica sostitutiva è spesso solo parzialmente efficace nella maggior parte dei pazienti, sia perché iniziata in una fase troppo avanzata di malattia sia per l'attivazione di meccanismi secondari diversi dall'accumulo di glicosfingolipidi e che contribuisce comunque alla patogenesi della malattia di Fabry. Una migliore conoscenza delle vie biochimiche secondarie coinvolte nella patogenesi della malattia di Fabry, così come quelle coinvolte nell'infiammazione cronica, possono favorire la scoperta di nuovi approcci terapeutici oltre la terapia enzimatica sostitutiva.

Poiché nei nostri pazienti con malattia di Fabry non è stata trovata alcuna correlazione fra il condroitinsolfato plasmatico e i livelli di bicunina urinaria e nessuna differenza è stata evidenziata nel plasma fra livello di condroitin solfato e la struttura tra pazienti e controlli, l'origine dei livelli più elevati di bicunina nell'urina può stare ad indicare un diretto coinvolgimento renale. Recenti analisi in RT-PCR evidenziano e documentano che diversi organi umani, che esprimono bicunina, incluso il rene, sostengono la nostra ipotesi (Itoh et al., 1996).

Inoltre non è stata trovata una correlazione significativa fra livelli di bicunina urinaria e creatinina sierica, quindi il solo danno renale non sembra essere sufficiente a spiegare i livelli elevati di bicunina. Nondimeno l'origine del livello di bicunina urinaria e il meccanismo attraverso il quale i livelli urinari nei nostri pazienti sono elevati rimane non chiaro e necessita di ulteriori valutazioni.



## 5. Conclusioni

La malattia di Fabry è una malattia ereditaria, multisistemica e progressiva, caratterizzata da specifici segni neurologici, renali, cardiovascolari, oculari e cutanei.

Il difettoso metabolismo dei glicosfingolipidi per la diminuzione dell'attività enzimatica dell'alfa galattosidasi A, provoca l'accumulo di glicosfingolipidi neutri, in varie tipologie cellulari e preminentemente negli endoteli. Ciò a sua volta scatena una cascata di eventi cellulari.

Con l'età, si verifica un deterioramento progressivo dei diversi sistemi che può provocare insufficienza d'organo con limitazione della prospettiva di vita dei pazienti di entrambi i sessi, con una riduzione di circa 30 e 20 anni, rispettivamente, rispetto alla popolazione generale.

Considerato che la malattia di Fabry è una condizione clinica attualmente trattabile e che la corretta diagnosi ha sostanziali, potenziali implicazioni per altri componenti del gruppo familiare del paziente, il riconoscimento di questa patologia è indispensabile.

Sebbene sia disponibile una terapia specifica (terapia di sostituzione enzimatica), la sua efficacia nel contrastare la progressione di malattia è ancora in fase di studio. Molteplici trial sono stati effettuati sia per determinare l'efficacia a lungo termine della ERT, che per evidenziare gli effettivi target d'azione della molecola.

Promettenti sono gli effetti su cuore e rene, mentre non è ancora chiaro se il farmaco abbia un effetto diretto sul sistema nervoso centrale, ma sembra che non sia in grado di attraversare la BEE.

Gli obiettivi degli studi in atto sono quindi diversi: in primis quello di stabilire la diagnosi più precocemente possibile, dato che l'efficacia della terapia è maggiore, tanto più precocemente essa viene iniziata. In secondo luogo quello di controllare i pazienti nel tempo e monitorare eventuali miglioramenti o la progressione dei sintomi/segni, e quindi rimodulare i provvedimenti terapeutici con la ERT o con i farmaci sintomatici, comunque indispensabili per questi pazienti.

Con i nostri due studi abbiamo cercato di comprendere nuovi aspetti della fisiopatologia della malattia per cercare di venire incontro alle necessità di orientamento dei clinici, e quindi migliorare la gestione diagnostico-terapeutica dei pazienti.

La capacità diagnostica aumenta se ci sono parametri clinici o paraclinici indicativi della presenza di danno d'organo, in particolare a livello renale e cardiaco e, dato il caso particolare

della malattia di Fabry dove è spesso presente danno cerebrovascolare in età precoce, anche a livello del sistema nervoso.

Nel nostro primo studio abbiamo cercato di comprendere se ci fossero modificazioni nella trasmissione nervosa dei pazienti con malattia di Fabry tramite protocolli prestabiliti di stimolazione magnetica transcranica e se le alterazioni potessero essere influenzate dalla ERT. I risultati del presente studio dimostrano, per la prima volta, la presenza di definite alterazioni neurofisiologiche a livello della corteccia motoria nei pazienti con malattia di Fabry. In particolare lo studio ha riscontrato un incremento dell'eccitabilità nella corteccia motoria in questa malattia

Questo può spiegare anche la genesi del dolore nella malattia di Fabry, considerando che il glutammato è un trasmettitore essenziale nella via del dolore sia nel sistema nervoso centrale che periferico.

Dato che nella malattia di Fabry sia la vasculopatia cerebrale che l'accumulo di glicosfingolipidi nelle cellule gliali e neuroni sono diffusi all'intero encefalo, abbiamo assunto che le alterazioni elettrofisiologiche documentate nella corteccia motoria potessero essere presenti anche nelle altre regioni cerebrali, anche perché nella IN-OUT curve, si evidenziava una diffusa maggiore eccitabilità nei pazienti

Come si possa creare tale alterazione elettrofisiologica non è chiaro ma abbiamo ipotizzato che potesse essere un correlato neurofisiologico diversi eventi patologici:

sia il danno diretto sui neuroni, che l'accumulo progressivo di glicosfingolipidi nell'endotelio vascolare e nelle cellule muscolari lisce. Ciò porta a una alterazione nella circolazione locoregionale dell'encefalo e quindi ad una conseguente ischemia e progressivo danno cerebrovascolare in età precoce (Moore et al., 2007; Zarate e Hopkin, 2008; Bersano et al., 2012).

In questo contesto, nella corteccia motoria dei pazienti con malattia di Fabry, è probabile che vi sia una riduzione della capacità di riassorbimento del glutammato da parte degli astrociti danneggiati dall'ischemia, con conseguente aumento della concentrazione del glutammato extracellulare (Rossi et al., 2007; Sofroniev e Vinters, 2010) e l'ischemia, causando una perdita del gradiente ionico, può anche indurre il rilascio di glutammato dalle cellule neuronali (Bersano et al., 2012).

Ulteriore dato interessante e nuovo della nostra ricerca è il riscontro che l'ipereccitabilità della corteccia motoria era evidente anche nei pazienti senza lesioni alla risonanza magnetica, come se nei pazienti con malattia di Fabry le alterazioni elettrochimiche potessero rappresentare una lesione funzionale, più precoce di quella strutturata e visibile al neuroimaging, e quindi potenzialmente reversibile con la ERT.

Nell'esperimento pilota, nel quale abbiamo analizzato l'effetto di un anno di terapia enzimatica sostitutiva sull'eccitabilità corticale, abbiamo osservato una significativa riduzione dell'iper-eccitabilità della corteccia motoria rispetto ai valori basali. Dato che l'enzima non è capace di attraversare la barriera ematoencefalica questo trend è probabilmente dovuto a un incremento del flusso cerebrale dopo un anno di terapia enzimatica sostitutiva (Moore et al., 2002; Das e Naim, 2009; Bersano et al., 2012).

Nel secondo studio invece abbiamo cercato di comprendere se nella patologia fossero colpite altre vie biochimiche oltre alla via classica e se lo studio di queste potessero aiutare i clinici nella diagnostica della malattia.

Nelle malattie da accumulo lisosomiale vi sono meccanismi biochimici secondari diversi dall'accumulo di glicosfingolipidi che a loro volta contribuiscono alla patogenesi della malattia di Fabry ed è possibile la presenza di metaboliti secondari i quali possono essere utilizzati come biomarkers che possono risultare utili nel follow-up dei pazienti e della malattia e diventare potenziali target di una terapia aggiuntiva (Futerman et al., 2004; Vitner et al., 2010).

Una migliore conoscenza delle vie biochimiche secondarie coinvolte nella patogenesi della malattia di Fabry, potrebbe favorire la scoperta di nuovi approcci terapeutici potenzialmente utili per il trattamento di questa malattia che si andrebbero ad aggiungere alla terapia enzimatica sostitutiva.

Dato che il danno renale è una frequente e severa complicazione della malattia di Fabry, nel nostro studio biochimico, abbiamo pensato di valutare i glicosaminoglicani plasmatici e urinari in questa patologia per capire se la loro escrezione urinaria possa rappresentare un utile e precoce marcatore di danno renale nei pazienti con la malattia di Fabry

In modo particolare, abbiamo notato che i livelli di bicunina urinaria sono significativamente più elevati nei pazienti con malattia di Fabry con disfunzione renale (lieve o moderata-grave), rispetto ai livelli evidenziati nei controlli.

I risultati ottenuti suggeriscono che i livelli di questo proteoglicano nelle urine, così come la proteinuria, possano rappresentare un precoce biomarker indicativo di danno renale, utile per monitorare la funzionalità renale nei pazienti clinicamente asintomatici.

E' interessante notare che diversi pazienti con malattia di Fabry trattati con terapia enzimatica sostitutiva hanno, mostrato elevati livelli di bicunina nelle urine. Sebbene in questo, studio non avessimo inizialmente pianificato un disegno formale mirato a valutare i livelli di bicunina urinaria e dopo un certo periodo di trattamento con terapia enzimatica sostitutiva, quanto evidenziato è in accordo con diversi dati clinici dai quali emerge come la terapia enzimatica sostitutiva può cambiare in maniera significativa la progressione naturale della

malattia specie se la ERT viene iniziata prima che compaiano negli organi lesioni irreversibili (Metha et al., 2009; Ortu et al., 2013).

Inoltre i livelli di biconina plasmatici e urinari sono probabilmente correlati alla sua attività antiinfiammatoria (Pugia et al., 2007) e diversi studi hanno associato elevati livelli nel plasma e nelle urine di questo proteoglicano con diverse malattie dove è presente un'infiammazione cronica. Dunque si può pensare che questo marcatore possa correlare con l'infiammazione ed essere utilizzato come biomarcatore anche in questo senso.

In conclusione la stimolazione magnetica transcranica può essere utile nello studio di pazienti con malattia di Fabry per evidenziare alterazioni precoci nell'eccitabilità, verosimile segno di lesioni encefaliche biochimiche in fase iniziale e pertanto potenzialmente reversibili.

Il fatto che vi sia una riduzione dell'ipereccitabilità nella corteccia motoria in 5 pazienti dopo la terapia enzimatica sostitutiva dovrebbe motivare l'estensione della valutazione neurofisiologica a un gruppo più ampio di pazienti per valutare il possibile uso di questa metodica nella pratica clinica per il follow up dei pazienti.

Il riscontro di biconina urinaria elevata in pazienti con malattia di Fabry e danno renale di qualsiasi entità può rappresentare un biomarker precoce, indicativo di danno renale, utile per monitorare la funzionalità renale nei pazienti con malattia di Fabry, anche quelli ancora clinicamente asintomatici.

Inoltre, gli elevati livelli urinari di questo metabolita secondario suggeriscono la attivazione secondaria di una via biochimica correlata all'infiammazione, in risposta all'accumulo di glicosfingolipidi.

Comunque, date le piccole dimensioni degli studi, i risultati ottenuti sono da considerarsi preliminari, e richiedono conferme in un campione più grande.

## 6 Bibliografia

Anderson W. A case of “Angio-keratoma”. *Br J Dermatol* 1898, 10:113-117.

Baptista MV, Ferreira S, Pinho EMT, 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; 41: 431–436.

Bersano A, Lanfranconi S, Valcarengi C, Bresolin N, Micieli G, Baron P. Neurological features of Fabry disease: clinical, pathophysiological aspects and therapy. *Acta Neurol Scand* 2012;126:77-97.

Biegstraaten M, Hollak CE, Bakkers M, Faber CG, Aerts JM, van Schaik IN. Small fiber neuropathy in Fabry disease. *Mol Genet Metab* 2012;136:135–41.

Bitter T and Muir HM, “A modified uronic acid carbazole reaction,” *Analytical Biochemistry*, vol. 4, no. 4, pp. 330–334, 1962.

Brady RO, Gal AE, Bradley RM et al. Enzymatic defect in Fabry’s disease: ceramide-trihexosidase deficiency. *N Engl J Med* 1967, 276:1163-1167.

Brakch N, Dormond O, Bekri S et al. Evidence for a role of sphingosine-1 phosphate in cardiovascular remodelling in Fabry disease. *Eur Heart J* 2010, 31:67-76.

Branton MH, Schiffmann R, Sabnis SG et al. “Natural history of fabry renal disease: influence of  $\alpha$ -galactosidase activity and genetic mutations on clinical course, *Medicine*, vol. 81, no. 2, pp. 122–138, 2002.

Breunig F and Wanner C. Update on Fabry disease: kidney involvement, renal progression and enzyme replacement therapy, *Journal of Nephrology*, vol. 21, no. 1, pp. 32–37, 2008.

Brouns R, Sheorajpanday R, Braxel E et al: Middelheim Fabry Study (MiFaS): a retrospective Belgian study on the prevalence of Fabry disease in young patients with cryptogenic stroke. *Clin Neurol Neurosurg* 2007, 109:479-484.

Brouns R, Thijs V, Eyskens F et al. Belgian Fabry study: prevalence of Fabry disease in a cohort of 1000 young patients with cerebrovascular disease. *Stroke* 2010, 41:863-868.

Burlina AP, Manara R, Caillaud C et al. The pulvinar sign: frequency and clinical correlations in Fabry disease. *J Neurol* 2008, 255:738-744.

Bütefisch CM, Netz J, Wessling M, Seitz RJ, Hömberg V. Remote changes in cortical excitability after stroke. *Brain* 2003;126:470–81.

Cable WJ, Kolodny EH, Adams RD. Fabry disease: impaired autonomic function. *Neurology* 1982, 32:498-502.

Cabrera-Salazar MA, O'Rourke E, Charria-Ortiz G et al. Radiological evidence of early cerebral microvascular disease in young children with Fabry dis. *J Pediatr* 2005,147:102-105.

Cantello R, Gianelli M, Civardi C, Mutani R. Magnetic brain stimulation: the silent period after the motor evoked potential. *Neurology* 1992; 42:1951-9.

Cappelletti R, Del Rosso M, and Chiarugi VP, "A new electrophoretic method for the complete separation of all known animal glycosaminoglycans in a monodimensional run," *Analytical Biochemistry*, vol. 99, no. 2, pp. 311-315, 1979.

Chen R, Cros D, Curra A, Di Lazzaro V, Lefaucheur JP, Magistris MR, et al. The clinical diagnostic utility of transcranial magnetic stimulation: report of an IFCN committee. *Clin Neurophysiol* 2008;119: 504-32.

Chevrier M, Brakch N, Lesueur C et al. Autophagosome maturation is impaired in Fabry disease. *Autophagy* 2010.

Camacho A, Massieu L. Role of glutamate transporters in the clearance and release of glutamate during ischemia and its relation to neuronal death. *Arch Med Res* 2006;37:11-8.

Clavelou P, Besson G, Elziere C et al. [Neurological aspects of Fabry's disease]. *Rev Neurol (Paris)* 2006, 162:569-580.

Cole AL, Lee PJ, Hughes DA et al. Depression in adults with Fabry disease: a common and underdiagnosed problem. *J Inherit Metab Dis* 2007, 30:943-951.

Das AM, Naim HY. Biochemical basis of Fabry disease with emphasis on mitochondrial function and protein trafficking. *Adv Clin Chem* 2009;49:57-71.

De Duve C. Exploring cells with a centrifuge. *Science* 1975;189:186-94. deVeber GA, Schwarting GA, Kolodny EH, Kowall NW. Fabry disease: immunocytochemical characterization of neuronal involvement. *Ann Neurol* 1992;31:409-15.

DeGraba T, Azhar S, Dignat-George F et al. Profile of endothelial and leukocyte activation in Fabry patients. *Ann Neurol* 2000, 47:229-233

De Lin S, Endo R, Kuroda H et al. "Plasma and urine levels of urinary trypsin inhibitor in patients with chronic liver diseases and hepatocellular carcinoma," *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, vol. 19, no. 3, pp. 327-332, 2004.

De Muro P, Capobianco G, Formato M et al. "Glycosaminoglycan and transforming growth factor  $\beta$ 1 changes in human plasma and urine during the menstrual cycle, in vitro fertilization treatment, and pregnancy," *Fertility and Sterility*, vol. 92,no.1, pp. 320–327, 2009.

De Muro P, Faedda R, Formato M et al. "Urinary glycosaminoglycans in patients with systemic lupus erythematosus," *Clinical and Experimental Rheumatology*, vol. 19, no. 2, pp. 125–130, 2001

DeMuro P, Faedda R, Masala A et al. "Kidney post-transplant monitoring of urinary glycosaminoglycans/proteoglycans and monokine induced by IFN- $\gamma$  (MIG)," *Clinical and Experimental Medicine*, vol. 13, no. 1, pp. 59–65, 2013.

DeMuro P, Fresu P, Tonolo G et al. "A longitudinal evaluation of urinary glycosaminoglycan excretion in normoalbuminuric type 1 diabetic patients," *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, vol. 44, no. 5, pp. 561–567, 2006.

De Muro P, Faedda R, Satta A et al., "Urinary glycosaminoglycan composition in chronic glomerulonephritis," *Journal of Nephrology*, vol. 18, no. 2, pp. 154–160, 2005.

De Muro P, Faedda R, Satta A et al. "Quali-quantitative analysis of urinary glycosaminoglycans for monitoring glomerular inflammatory activity," *Scandinavian Journal of Urology and Nephrology*, vol. 41, no. 3, pp. 230–236, 2007.

Desnick RJ, Ioannou YA, Eng CM. Alpha-galactosidase A deficiency: Fabry disease. In *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. Edited by: Scriver CR et al. New York: McGraw Hill; 2001:3733-3774.

Desnick R. J. and Brady R. O. Fabry disease in childhood, *Journal of Pediatrics*, vol. 144, no. 5, Supplement, pp. S20–S26, 2004.

Di Lazzaro V, Oliviero A, Profice P, et al. Ketamine increases human motor cortex excitability to transcranial magnetic stimulation. *J Physiol* 2003; 547:485–96.

Di Lazzaro V, Profice P, Ranieri F, et al. I-wave origin and modulation. *Brain Stimul* 2012;5:512–25.

Dutsch M, Marthol H, Stemper B et al. Small fiber dysfunction predominates in Fabry neuropathy. *J Clin Neurophysiol* 2002 19:575-586.

Elliott PM, Kindler H, Shah JS et al. Coronary microvascular dysfunction in male patients with Anderson-Fabry disease and the effect of treatment with alpha galactosidase A. *Heart* 2006, 92:357 360.

Eng CM, Germain DP, Banikazemi M et al. Fabry disease: guidelines for the evaluation and management of multiorgan system involvement. *Genet Med* 2006, 8:539-548.

Esko JD, Kimata K, and Lindahl U. "Proteoglycans and sulfated glycosaminoglycans," in *Essential of Glycobiology*, A.Varki, R. D. Cummings, J. D. Esko et al., Eds., Chapter 16, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA, 2nd edition, 2009.

Esser SK, Hill SL, Tononi G. Modeling the effects of transcranial magnetic stimulation on cortical circuits. *J Neurophysiol* 2005; 94:622–39.

Fabry J. Ein Beitrag zur Kenntnis der Purpura haemorrhagica nodularis (Purpura papulosa hemorrhagica Hebrae). *Arch Dermatol Syphilol* 1898, 43:187-200

Fabry Outcome Survey. [<http://www.globaloutcomesurveys.com>]

Fabry Registry. [<http://www.lsdregistry.net/fabryregistry/>].

Fancellu L, Deiana GA, Sechi GP. Teaching NeuroImages: Neuroimaging leads to recognition of previously undiagnosed Fabry disease. *Neurology* 2010;75:e28

Fancellu L, Borsini W, Romani I et al. Exploratory screening for Fabry's disease in Young adults with cerebrovascular disorders in northern Sardinia. *BMCN* under revision.

Fazekas F, Kleinert R, Offenbacher H et al. Pathologic correlates of incidental MRI white matter signal hyperintensities. *Neurology* 1993, 43:1683-1689.

Fellgiebel A, Muller MJ, Ginsberg L. CNS manifestations of Fabry's disease. *Lancet Neurol* 2006, 5:791-795.

Fellgiebel A, Albrecht J, Dellani PR et al. Quantification of brain tissue alterations in Fabry disease using diffusion-tensor imaging. *Acta Paediatr Suppl* 2007, 96:33-36.

Fellgiebel A, Keller I, Marin D et al. Diagnostic utility of different MRI and MR angiography measures in Fabry disease. *Neurology* 2009, 72:63-68.

Feriozzi S, Schwarting A, Sunder-Plassmann G et al. Agalsidase alfa slows the decline in renal function in patients with Fabry disease. *Am J Nephrol* 2008, 29:353-361.

Fervenza FC, Torra R, Lager DJ. Fabry disease: an underrecognized cause of proteinuria. *Kidney Int* 2008, 73:1193-1199.

Fisher RJ, Nakamura Y, Bestmann S, Rothwell JC et al. Two phases of intracortical inhibition revealed by transcranial magnetic threshold tracking. *Exp Brain Res* 2002; 143:240–8.

Fogo AB, Bostad L, Svarstad E et al. Scoring system for renal pathology in Fabry disease: report of the international study group of fabry nephropathy (ISGFN). *Nephrol Dial Transplant* 2010, 25:2168-2177.



Froissart R, Guffon N, Vanier MT et al. Fabry disease: D313Y is an alpha-galactosidase A sequence variant that causes pseudodeficient activity in plasma. *Mol Genet Metab* 2003, 80:307-314.

Froissart M, Benistan K, Germain DP. Functional renal investigation in Fabry disease. *Presse Med* 2007, 36:S36-42.

Futerman AH, van Meer G. The cell biology of lysosomal storage disorders. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004;5:554–65.

Germain DP: A new phenotype of Fabry disease with intermediate severity between the classical form and the cardiac variant. *Contrib Nephrol* 2001, 136:234-240

Germain DP: [Fabry's disease (alpha-galactosidase-A deficiency): physiopathology, clinical signs, and genetic aspects]. *J Soc Biol* 2002, 196:161-173.

Germain DP. Fabry disease. *Orphanet J Rare Dis* 2010; 22:5–30.

Ginsberg L. Nervous system manifestations of Fabry disease: data from FOS the Fabry outcome survey. In: Mehta A, Beck M, Sunder-Plassmann G, editors. *Fabry disease: perspectives from 5 years of FOS*. Oxford: Oxford PharmaGenesis; 2006[Chapter 23].

Ginsberg L, Manara R, Valentine AR et al. Magnetic resonance imaging changes in Fabry disease. *Acta Paediatr Suppl* 2006, 95:57-62.

Gold KF, Pastores GM, Botteman M et al. Quality of life of patients with Fabry disease. *Qual Life Res* 2002, 11:317-327.

Gubler MC, Lenoir G, Grunfeld JP et al. Early renal changes in hemizygous and heterozygous patients with Fabry's disease. *Kidney Int* 1978, 13:223-235.

Guce AI, Garman SC: The structure of human  $\alpha$ -galactosidase A and implications for Fabry disease. In *Fabry disease*. Edited by: Elstein D, Altarescu G, Beck M. Dordrecht, Heidelberg, London, New-York: Springer; 2010:21-38.(A)

Guce AI, Clark NE, Salgado EN, Ivanen DR, Kulminskaya AA, Brumer H, Garman SC: Catalytic mechanism of human alpha-galactosidase. *J Biol Chem* 2010, 285:3625-3632.(B)

Hallett M, Chen R, Ziemann U, Cohen LG. Reorganization in motor cortex in amputees and in normal volunteers after ischemic limb deafferentation. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol Suppl* 1999;5:183–7.

- Hanajima R, Ugawa Y, Terao Y, Enomoto H, Shiio Y, Mochizuki H, et al. Mechanisms of intracortical I-wave facilitation elicited with paired-pulse magnetic stimulation in humans. *J Physiol* 2002; 538:253–61.
- Hilz MJ, Kolodny EH, Brys M et al. Reduced cerebral blood flow velocity and impaired cerebral autoregulation in patients with Fabry disease. *J Neurol* 2004, 251:564-570.
- Hoffmann B, Schwarz M, Mehta A, et al. Gastrointestinal symptoms in 342 patients with Fabry disease: prevalence and response to enzyme replacement therapy. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2007, 5:1447-1453.
- Hopkin RJ, Bissler J, Banikazemi M et al. Characterization of Fabry Disease in 352 Pediatric Patients in the Fabry Registry. *Pediatr Res* 2008, 64:550-555.
- Huang YZ, Lai SC, Lu CS, Weng YH, Chuang WL, Chen RS. Abnormal cortical excitability with preserved brainstem and spinal reflexes in sialidosis type I. *Clin Neurophysiol* 2008;119:1042–50.
- Hwu WL, Chien YH, Lee NC 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). *Hum Mutat* 2009, 30:1397-1405.
- Ikoma K, Samii A, Mercuri B, Wassermann EM, Hallett M. Abnormal cortical motor excitability in dystonia. *Neurology* 1996;46:1371–6.
- Itoh H, Tomita M, Kobayashi T et Al. “Expression of inter- $\alpha$ -trypsin inhibitor light chain (bikunin) in human pancreas,” *Journal of Biochemistry*, vol. 120, no. 2, pp. 271–275, 1996.
- Kalliokoski RJ, Kalliokoski KK, Sundell J et al. Impaired myocardial perfusion reserve but preserved peripheral endothelial function in patients with Fabry disease. *J Inherit Metab Dis* 2005, 28:563-573
- Kampmann C, Wiethoff CM, Whybra et al. Cardiac manifestations of Anderson-Fabry disease in children and adolescents. *Acta Paediatr* 2008, 97:463-469.
- Kampmann C, Baehner F, Whybra C et al. Cardiac manifestations of Anderson-Fabry disease in heterozygous females. *J Am Coll Cardiol* 2002, 40:1668-1674.
- Kaneski CR, Moore DF, Ries M et al. Myeloperoxidase predicts risk of vasculopathic events in hemizygous males with Fabry disease. *Neurology* 2006, 67:2045-2047
- Kikumoto Y, Kai Y, Morinaga H et al. “Fabry disease exhibiting recurrent stroke and persistent inflammation,” *Internal Medicine*, vol. 49, no. 20, pp. 2247–2252, 2010.
- Kint JA: The enzyme defect in Fabry’s disease. *Nature* 1970, 227:1173.

- Kujirai T, Caramia MD, Rothwell JC et al. Corticocortical inhibition in human motor cortex. *J Physiol* 1993; 471:501–19.
- Lapitskaya N, Moerk SK, Gosseries O et al. Corticospinal excitability in patients with anoxic, traumatic, and non-traumatic diffuse brain injury. *Brain Stimul* 2013.
- Lepedda AJ, Fancellu L, Zinellu E et al. Urine Bikunin as a marker of renal impairment in Fabry's disease. *Biomed Research Int.* Vol.2013, art ID 205948.
- Linhart A, Palecek T, Bultas J et al. New insights in cardiac structural changes in patients with Fabry's disease. *Am Heart J* 2000, 139:1101-1108.
- Lyon MF: Gene action in the X-chromosome of the mouse (*mus musculus* L.). *Nature* 1961 190:372-373
- Lucke T, Hoppner W, Schmidt E et al. Fabry disease: reduced activities of respiratory chain enzymes with decreased levels of energy-rich phosphates in fibroblasts. *Mol Genet Metab* 2004, 82:93-97.
- Ly M, Leach FE, Laremore TN et al. "The proteoglycan bikunin has a defined sequence," *Nature Chemical Biology*, 2011; vol. 7, no. 11, pp. 827–833.
- MacDermot KD, Holmes A, Miners A. Anderson-Fabry disease: clinical manifestations and impact of disease in a cohort of 60 obligate carrier females. *J Med Genet* 2001, 38:769-775.
- Magage S, Lubanda JC, Germain DP et al. [Respiratory involvement in patients with Fabry disease]. *Med Sci (Paris)* 2005, 21:37-39.
- Marino S, Borsini W, Buchner S et al. Diffuse structural and metabolic brain changes in Fabry disease. *J Neurol* 2006; 253:434-40.
- Marquardt L, Baker R, Segal H et al. Fabry disease in unselected patients with TIA or stroke: population-based study. *Eur J Neurology* 2012 doi: 10.1111/j.1468-1331.2012.03739.x
- Matsumoto RR, Truong DD, Nguyen KD, Dang AT, Hoang TT, Vo PQ, et al. Involvement of GABA(A) receptors in myoclonus. *Mov Disord* 2000;15:47–52.
- Matsuzaki H, Kobayashi H, Yagy T et al., "Plasma bikunin as a favorable prognostic factor in ovarian cancer," *Journal of Clinical Oncology*, 2005; vol. 23, no. 7, pp. 1463–1472,
- Mehta A, Beck M, Eyskens F et al. Fabry disease: a review of current management strategies. *QJM* 2010, 103:641-659.

Meikle PJ, Hopwood JJ, Clague AE et al. Prevalence of lysosomal storage disorders. *JAMA* 1999, 281:249-254.

Mendez MF, Stanley TM, Medel NM et al. The vascular dementia of Fabry's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord* 1997, 8:252-257.

Mehta A, Beck M, Elliott P et al. "Enzyme replacement therapy with agalsidase alfa in patients with Fabry's disease: an analysis of registry data," *The Lancet*, vol. 374, no. 9706, pp. 1986–1996, 2009.

Mills KR, Murray NM. Electrical stimulation over the human vertebral column: which neural elements are excited? *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 1986; 63:582–9.

Miners AH, Holmes A, Sherr L et al. Assessment of health-related quality-of-life in males with Anderson Fabry Disease before therapeutic intervention. *Qual Life Res* 2002, 11:127-133.

Mitsias P, Levine SL: Cerebrovascular complications of Fabry's disease. *Ann Neurol* 1996, 40:8 17.

Mohrenschlager M, Braun-Falco M, Ring J et al. Fabry disease: recognition and management of cutaneous manifestations. *Am J Clin Dermatol* 2003, 4:189-196.

Moore DF, Scott LT, Gladwin MT et al. Regional cerebral hyperperfusion and nitric oxide pathway dysregulation in Fabry disease: reversal by enzyme replacement therapy. *Circulation* 2001, 104:1506-1512

Moore DF, Altarescu G, Herscovitch P, Schiffmann R. Abnormal cerebrovascular reactivity in Fabry disease is reversed following enzyme replacement therapy. *BMC Neurol* 2002;18:2–4.

Moore DF, Altarescu G, Ling GS et al. Elevated cerebral blood flow velocities in Fabry disease with reversal after enzyme replacement. *Stroke* 2002, 33:525-531.

Moore DF, Altarescu G, Barker WC, Patronas NJ, Herscovitch P, Schiffmann R. White matter lesions in Fabry disease occur in 'prior' selectively hypometabolic and hyperperfused brain regions. *Brain Res Bull* 2003;62:231–40.

Moore DF, Kaneshi CR, Askari H, Schiffmann R. The cerebral vasculopathy of Fabry disease. *J Neurol Sci* 2007; 257:258–63.

Nakao S, Kodama C, Takenaka T et al. Fabry disease: detection of undiagnosed hemodialysis patients and identification of a "renal variant" phenotype. *Kidney Int* 2003, 64:801-807.

Naleschinski D, Arning K, Baron R. Fabry disease - Pain doctors have to find the missing ones. *Pain* 2009, 145:10-11.

Neufeld EF: Lysosomal storage diseases. *Annu Rev Biochem* 1991, 60:257-280.

Newman EA. New roles for astrocytes: regulation of synaptic transmission. *Trends Neurosci* 2003;26:536-42.

Niemann M, Breunig F, Beer M et al. The right ventricle in Fabry disease: natural history and impact of enzyme replacement therapy. *Heart* 2010.

Okeda R, Nisihara M. An autopsy case of Fabry disease with neuropathological investigation of the pathogenesis of associated dementia. *Neuropathology* 2008;28:532-40.

Orteu CH, Jansen T, Lidove O et al. Fabry disease and the skin: data from FOS, the Fabry Outcome Survey. *Br J Dermatol* 2007, 157:331-337.

Ortu E, Deriu F, Suppa A, Tolu E, Rothwell JC. Effects of volitional contraction on intracortical inhibition and facilitation in the human motor cortex. *J Physiol* 2008;586:5147-59.

Ortu E, Fancellu L, Sau G et al. "Primary motor cortex hyperexcitability in Fabry's disease," *Clinical Neurophysiology*, 2013.

Park S, Kim JA, Joo KY et al. Globotriaosylceramide leads to KCa3.1 channel dysfunction: A new insight into endothelial dysfunction in Fabry disease. *Cardiovasc Res* 2010.

Perretti A, Parenti G, Balbi P, Titomanlio L, Marcantonio L, Iapoce M, et al. Study of multimodal evoked potentials in patients with type 1 Gaucher's disease. *J Child Neurol* 2005;20:124-8.

Pieroni M, Chimenti C, Russo A et al. Tissue Doppler imaging in Fabry disease. *Curr Opin Cardiol* 2004, 19:452-457.

Poorthuis BJ, Wevers RA, Kleijer WJ et al. The frequency of lysosomal storage diseases in The Netherlands. *Hum Genet* 1999, 105:151-156.

Pugia MJ, Valdes R Jr., and Jortani SA. "Bikunin (urinary trypsin inhibitor): structure, biological relevance, and measurement," *Advances in Clinical Chemistry*, vol. 44, pp. 223-245, 2007.

Ramaswami U, Whybra C, Parini R et al. Clinical manifestations of Fabry disease in children: data from the Fabry Outcome Survey. *Acta Paediatr* 2006, 95:86-92.

Ries M, Clarke JTR, Whybra C et al. "Enzyme-replacement therapy with agalsidase alfa in children with Fabry disease," *Pediatrics*, vol. 118, no. 3, pp. 924–932, 2006.

Rogoz K, Lagerström MC, Dufour S, Kullander K. VGLUT2-dependent glutamatergic transmission in primary afferents is required for intact nociception in both acute and persistent pain modalities. *Pain* 2012; 153:1525–36.

Rolfs A, Bottcher T, Zschesche M et al. Prevalence of Fabry disease in patients with cryptogenic stroke: a prospective study. *Lancet* 2005, 366:1794-1796.

Rombach SM, Dekker N, Bouwman MG et al. Plasma globotriaosylsphingosine: Diagnostic value and relation to clinical manifestations of Fabry disease. *Biochim Biophys Acta* 2010, 180:741-748.

Rossi DJ, Brady JD, Mohr C. Astrocyte metabolism and signaling during brain ischemia. *Nat Neurosci* 2007; 10:1377–86.

Rossini PM, Barker AT, Berardelli A et al. Noninvasive electrical and magnetic stimulation of the brain, spinal cord and roots: basic principles and procedures for routine clinical application. Report of an IFCN committee. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 1994; 91:79–92.

Rothwell JC, Hallett M, Berardelli A et al.. Magnetic stimulation: motor evoked potentials. The International federation of clinical neurophysiology. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol Suppl* 1999; 52:97–103.

Sakai K, Okudera H, and Hongo K. "Significant elevation of urinary trypsin inhibitor in patients with brain contusion—a preliminary report," *Journal of Clinical Neuroscience*, vol. 10, no. 6, pp. 677–679, 2003.

Salviati A, Burlina AP, Borsini W. Nervous system and Fabry disease, from symptoms to diagnosis: damage evaluation and follow-up in adult patients, enzyme replacement, and support therapy. *Neurol Sci* 2010, 31:299–306

Saposnik G, Lanthier S, Mamdani M et al. Canadian Stroke Consortium; Stroke Outcome Research Canada (SORCan) Working Group. Fabry's disease: a prospective multicenter cohort study in young adults with cryptogenic stroke. *Int J Stroke*. 2012 7(3):265-73

Sarikaya H, Yilmaz M, Michael N et al. Zurich Fabry study – prevalence of Fabry disease in young patients with first cryptogenic ischaemic stroke or TIA. *European Journal of Neurology* 2012 doi: 10.1111/j.1468-1331.2012.03737.

Schiffmann R: Fabry disease. *Pharmacol Ther* 2009, 122:65-77

Schiffmann R, Waldek S, Benigni A, and C. Auray-Blais, "Biomarkers of fabry disease nephropathy," *Clin Journ of the American Soc of Nephrology*, 2010 vol.5-2:360–364.

Schiffmann R, Warnock DG, Banikazemi M et al Fabry disease: progression of nephropathy, and prevalence of cardiac and cerebrovascular events before enzyme replacement therapy. *Nephrol Dial Transplant* 2009, 24:2102-2111.

Schwartz GJ, Munoz A, Schneider MF et al. New equations to estimate GFR in children with CKD. *J Am Soc Nephrol* 2009, 20:629-637.

Schwenkreis P, Witscher K, Janssen F, Addo A, Dertwinkel R, Zenz M, et al. Influence of the N-methyl-D-aspartate antagonist memantine on human motor cortex excitability. *Neurosci Lett* 1999; 270:137–40.

Segal P, Kohn Y, Pollak Y et al. Psychiatric and cognitive profile in Anderson-Fabry patients: a preliminary study. *J Inherit Metab Dis* 2010, 33:429-436.

Shen JS, Meng XL, Moore DF et al. Globotriaosylceramide induces oxidative stress and upregulates cell adhesion molecule expression in Fabry disease endothelial cells. *Mol Genet Metab* 2008, 95:163-168.

Shimizu T, Hosaki A, Hino T, Sato M, Komori T, Hirai S, et al. Motor cortical disinhibition in the unaffected hemisphere after unilateral cortical stroke. *Brain* 2002; 125:1896–907.

Sieber FE, Palmon SC, Traystman RJ, Martin LJ. Global incomplete cerebral ischemia produces predominantly cortical neuronal injury. *Stroke* 1995; 26:2091–5.

Sims K, Politei J, Banikazemi M, et al. 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, 40:788-794

Sodi A, Ioannidis AS, Mehta A et al. Ocular manifestations of Fabry's disease: data from the Fabry Outcome Survey. *Br J Ophthalmol* 2007, 91:210-214.

Sofroniew MV, Vinters HV. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol* 2010;119:7–35.

Spada M, Pagliardini S, Yasuda M et al. High incidence of later-onset fabry disease revealed by newborn screening. *Am J Hum Genet* 2006, 79:31-40.

Swayne OB, Rothwell JC, Ward NS, Greenwood RJ. Stages of motor output reorganization after hemispheric stroke suggested by longitudinal studies of cortical physiology. *Cereb Cortex* 2008;18:1909–22.

Sweeley CC, Klionsky B. Fabry's disease: classification as a sphingolipidosis and partial characterization of a novel glycolipid. *J Biol Chem* 1963, 238:3148-3150.

Tayebi N, Walker J, Stubblefield BK, et al. Gaucher disease with parkinsonian manifestations: does glucocerebrosidase deficiency contribute to a vulnerability to parkinsonism. *Mol Genet Metab* 2003;79:104–9.

Tedeschi G, Bonavita S, Banerjee TK, et al. Diffuse central neuronal involvement in Fabry disease: a proton MRS imaging study. *Neurology* 1999;52:1663–7.

The Human Gene Mutation Database at the Institute of Medical Genetics in Cardiff. [<http://www.hgmd.cf.ac.uk>].

Tokimura H, Di Lazzaro V, Tokimura Y et al. Short latency inhibition of human hand motor cortex by somatosensory input from the hand. *J Physiol* 2000;523:503–13.

Tondel C, Bostad L, Hirth A et al. Renal biopsy findings in children and adolescents with Fabry disease and minimal albuminuria. *Am J Kidney Dis* 2008, 51:767-776.

Tubira T, Goto L, Kuroiwa Y, Kikuki M. Neurophatological and biochemical studies in Fabry's disease. *Acta Neuropathol* 1974;30:345–54.

Valls-Solé J, Pascual-Leone A, Wassermann EM et al. Human motor evoked responses to paired transcranial magnetic stimuli. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 1992;85:355-64.

Valls-Solé J, Pascual-Leone A, Brasil-Neto JP, Cammarota A, McShane L, Hallett M. Abnormal facilitation of the response to transcranial magnetic stimulation in patients with Parkinson's disease. *Neurology* 1994;44:735–41.

van Breemen MJ, Rombach SM, Dekker N et al. Reduction of elevated plasma globotriaosylsphingosine in patients with classic Fabry disease following enzyme replacement therapy. *Biochim Biophys Acta* 2010.

Vedder AC, Bir'ó E, Aerts MFG, R. et Al. "Plasma markers of coagulation and endothelial activation in Fabry disease: impact of renal impairment," *Nephrology Dialysis Transplantation*, vol. 24, no. 10, pp. 3074–3081, 2009.

Vitner EB, Platt FM, and Futerman AH. "Common and uncommon pathogenic cascades in lysosomal storage diseases," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 285, no. 27, pp. 20423-20427, 2010.

von Scheidt W, Eng CM, Fitzmaurice TF et al. An atypical variant of Fabry's disease with manifestations confined to the myocardium. *N Engl J Med* 1991, 324:395-399.



Wanner C, Oliveira JP, Ortiz A et al. Prognostic indicators of renal disease progression in adults with Fabry disease: Natural history data from the Fabry Registry. *Clin J Am Soc Nephrol* 2010.

Warnock DG and West ML. "Diagnosis and management of kidney involvement in fabry disease," *Advances in Chronic Kidney Disease*, vol. 13, no. 2, pp. 138–147, 2006.

Wassermann EM, Samii A, Mercuri B et al. Responses to paired transcranial magnetic stimuli in resting, active, and recently activated muscles. *Exp Brain Res* 1996;109:158–63.

West M, Nicholls K, Mehta A et al. Agalsidase alfa and kidney dysfunction in Fabry disease. *J Am Soc Nephrol* 2009, 20:1132-1139.

Wozniak MA, Kittner SJ, Tuhim S et al. Frequency of unrecognized Fabry disease among young European-American and African-American men with first ischemic stroke. *Stroke* 2010, 41:78-81.

Yam GH, Zuber C, Roth J: A synthetic chaperone corrects the trafficking defect and disease phenotype in a protein misfolding disorder. *FASEB J* 2005, 19:12-18.

Yokoyama A, Yamazoe M, Shibata A: A case of heterozygous Fabry's disease with a short PR interval and giant negative T waves. *Br Heart J* 1987, 57:296-299.

Zarate YA, Hopkin RJ. Fabry's disease. *Lancet* 2008;372:1427–35.

Ziemann U, Lonnecker S, Steinhoff B et al. Effects of antiepileptic drugs on motor cortex excitability in humans: transcranial magnetic stimulation study. *Ann Neurol* 1996;40:367–78.

Ziemann U, Tergau F, Wassermann EM, Wischer S, Hildebrandt J, Paulus W. Demonstration of facilitatory I-wave interaction in the human motor cortex by paired transcranial magnetic stimulation. *J Physiol* 1998a;511:181–90.

Ziemann U, Chen R, Cohen LG, Hallett M. Dextromethorphan decreases the excitability of the human motor cortex. *Neurology* 1998b;51:1320-4.

Ziemann U, Rothwell JC. I-waves in motor cortex. *J Clin Neurophysiol* 2000;17:397–405.

Zinellu A, Lepedda A Jr., Sotgia S et al. "Albumin-bound low molecular weight thiols analysis in plasma and carotid plaques by CE," *Journal of Separation Science*, vol. 33, no. 1, pp. 126–131

## **Ringraziamenti**

Ringrazio innanzitutto Prof. GianPietro Sechi per i consigli ed il sostegno ricevuti in questi anni di collaborazione.

Un prezioso sostegno mi è stato dato dal Dott. Gianni Deiana, sempre disponibile ad aiutarmi a risolvere i più disparati problemi.

Un ringraziamento particolare va al Dott. Enzo Ortu e al Dott. Lapedda, insieme alla Prof. Formato, con i quali ho avuto modo di stabilire una fruttuosa e piacevole collaborazione. Ringrazio tutti i colleghi della clinica neurologica.

Ringrazio Giovannino, Danila, Leslie ed Enrico per il prezioso aiuto e i consigli ricevuti nelle ultime fasi di stesura di questa tesi.

Grazie ai miei genitori e ai miei amici per il sostegno durante tutti questi anni.

Ultimi ma non in ordine di importanza, ringrazio tutti i pazienti, veri e propri maestri di vita.